



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL:

**EFFECTO DEL BACILO CALMETTE-GUÉRIN (BCG)  
SOBRE LAS CÉLULAS *NATURAL KILLER*  
Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO DEL  
CÁNCER DE VEJIGA**

**Eva María García Cuesta**

*Madrid, 2016*



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL:

**EFFECTO DEL BACILO CALMETTE-GUÉRIN (BCG)  
SOBRE LAS CÉLULAS *NATURAL KILLER*  
Y SUS IMPLICACIONES EN EL TRATAMIENTO DEL  
CÁNCER DE VESIGA**

**Eva María García Cuesta**

(Licenciada en Bioquímica)

Memoria de tesis doctoral  
para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por: **Dra. Mar Valés Gómez**

Realizada en:  
**Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)**  
*Madrid, 2016*

Para mí, no hay emoción comparable a la que produce la actividad creadora, tanto en ciencia como en arte, literatura u otras ocupaciones del intelecto humano.

Mi mensaje, dirigido sobre todo a la juventud, es que **si sienten inclinación por la ciencia, la sigan, pues no dejará de proporcionarles satisfacciones inigualables.**

Cierto es que abundan los momentos de desaliento y frustración, pero estos se olvidan pronto, mientras que **las satisfacciones no se olvidan jamás.**

*Severo Ochoa de Albornoz*

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>19</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>23</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>29</b>
1. SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER	31
1.1. Inmunoterapia del Cáncer	32
1.2. Inmunoterapia con BCG	33
2. EL CÁNCER DE VEJIGA	34
2.1. Incidencia, Mortalidad Y Factores de Riesgo en el Cáncer de Vejiga	34
2.2. Clasificación del Cáncer de Vejiga	34
2.2.1. Clasificación histológica	34
2.2.2. Clasificación TNM	35
2.2.3. Clasificación según el grado de diferenciación	36
2.3. Tratamiento del Cáncer de Vejiga Superficial	36
2.3.1. Instilación intravesical de BCG	37
2.3.2. Instilación intravesical de mitomicina C	37
3. INMUNOTERAPIA CON BCG EN EL CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO-INVASIVO	37
3.1. Bacilo Calmette-Guérin o BCG	37
3.2. Calendario de Tratamiento	38
3.3. Mecanismo de Acción de la Inmunoterapia con BCG	39
3.3.1. BCG y las células uroteliales	39
3.3.2. BCG y las células del sistema inmunitario	40
3.3.3. BCG y las células NK	42
4. LAS CÉLULAS NATURAL KILLER	<b>43</b>
4.1. Receptores de las Células NK	45
4.1.1. Receptores activadores de las células NK	45
4.1.2. Receptores inhibidores de las células NK	46
4.1.3. Moléculas de adhesión de las células NK	47
4.1.4. Receptores de citoquinas y quimioquinas de las células NK	48
4.2. Activación de la Respuesta Citotóxica en las Células NK	48
<b>OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>57</b>
1. Reactivos	57
1.1. Anticuerpos	57
1.2. Proteínas de fusión NKp46 y NKp30 - Fc	59
1.3. Otros reactivos	59
2. Líneas celulares	59
3. Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	60
4. Purificación de células NK y establecimiento de líneas primarias	60
5. Separación celular utilizando un citómetro de flujo separador	60
6. BCG	61
7. Co-incubaciones con BCG	61
7.1. BCG y Células tumorales de vejiga	61
7.2. BCG y Células NK	61
7.3. BCG y PBMCs	62
8. Análisis por citometría de flujo	62
9. Ensayos de desgranulación	62
10. Bloqueo de receptores o MHC-I	63
11. Ensayos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)	64
12. Ensayos de citotoxicidad	64
13. Ensayos de producción de IFN $\gamma$	65
14. Ensayos de proliferación	65
15. Análisis de la viabilidad celular	66
16. Análisis Luminex	66
17. Análisis estadístico	67
<b>PACIENTES</b>	<b>67</b>
1. Procesamiento de las muestras de sangre	68
1.1. Análisis de las poblaciones celulares en sangre periférica	68
1.2. Purificación de PBMCs y plasma	68
2. Procesamiento de las muestras de orina	69
2.1. Medida de los factores solubles presentes en la orina de pacientes	69
<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
1. CÉLULAS TUMORALES DE VEJIGA: CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE BCG	73
1.1. Caracterización de las células tumorales uroteliales	73
1.1.1. Las distintas líneas tumorales de vejiga expresan diferentes patrones de expresión de moléculas capaces de estimular a las células NK	74

1.1.2.	<i>Las células NK activadas reconocen mejor a las células tumorales de vejiga más desdiferenciadas</i>	76
1.1.3.	<i>Las células tumorales de vejiga más diferenciadas son más sensibles a la lisis mediada por las células NK</i>	79
1.1.4.	<i>El reconocimiento de las células tumorales de vejiga por parte de las células NK está mediado, principalmente, por NKG2D</i>	79
1.2.	Efecto de BCG en las células tumorales de vejiga	82
1.2.1.	<i>El tratamiento con BCG no altera la expresión de los ligandos de NKG2D en las células tumorales uroteliales</i>	83
1.2.2.	<i>El tratamiento con BCG no altera el reconocimiento de las células tumorales uroteliales por parte de las células NK</i>	85
2.	CÉLULAS NK PURIFICADAS: EFECTO DE BCG EN CÉLULAS NK RECIÉN PURIFICADAS Y EN LÍNEAS DE CÉLULAS NK PRIMARIAS	86
2.1.	Efecto de BCG en líneas de células NK primarias	86
2.2.	Efecto de BCG en las células NK recién purificadas	87
3.	PBMCS Y CÉLULAS NK: EFECTO DE BCG EN LAS CÉLULAS NK EN EL CONTEXTO DEL TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA	88
3.1.	La estimulación con BCG de cultivos de PBMcs totales provoca la activación de una subpoblación de células NK CD56 <sup>bright</sup> citotóxica	88
3.2.	La población de células NK CD56 <sup>bright</sup> citotóxica se caracteriza por la expresión de CD16, KIR, CD94 y CD57	91
3.3.	La estimulación con BCG provoca la proliferación de las células NK CD56 <sup>bright</sup> citotóxicas y la muerte de las células NK CD56 <sup>dim</sup>	93
3.4.	La población de células NK CD56 <sup>bright</sup> citotóxica se genera, principalmente, a partir de células NK CD56 <sup>dim</sup>	95
3.5.	La población de células NK CD56 <sup>bright</sup> citotóxica aumenta el contenido de Perforina y Granzima B en sus gránulos líticos	97
3.6.	La citotoxicidad de la población de células NK CD56 <sup>bright</sup> está mediada, en parte, por NKG2D	98
3.7.	La población de células NK CD56 <sup>bright</sup> citotóxica aumenta su capacidad para mediar ADCC	99
3.8.	La estimulación con BCG produce un aumento en la capacidad de producción de IFN $\gamma$ en las células NK CD56 <sup>bright</sup> a día 3, que se pierde a día 7	100
3.9.	Los monocitos se ven afectados por la estimulación con BCG	102
3.10.	La población de células NK CD56 <sup>bright</sup> citotóxica se genera en respuesta a factores solubles	103
3.11.	El análisis de los factores solubles revela diferencias entre los cultivos sin estimular y estimulados con BCG	105

4. ESTUDIO PILOTO EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO-INVASIVO TRATADOS CON BCG	108
4.1. El porcentaje de células NK y el de la población de células NK CD56 <sup>bright</sup> no cambia en sangre periférica en respuesta al tratamiento con BCG	109
4.2. Los niveles de expresión del receptor NKG2D disminuyen en las células NK CD56 <sup>bright</sup> en respuesta al tratamiento, mientras que los niveles de NKp46 y CD16 no varían	110
4.3. Las PBMCs de pacientes de cáncer de vejiga también generan NK CD56 <sup>bright</sup> Tras la estimulación con BCG <i>in vitro</i>	112
4.4. El análisis de los factores solubles en la orina de los pacientes tratados con BCG revela un posible papel para la quimioquina IP-10 como biomarcador	112
4.5. La estimulación <i>in vitro</i> con BCG produce un aumento de la expresión del receptor de IP-10 (CXCR3) en las células NK	115
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>133</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>137</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>153</b>



# RESUMEN

La inmunoterapia con el bacilo Calmette-Guérin (BCG) se lleva utilizando con éxito para el tratamiento del cáncer de vejiga superficial desde hace 40 años, reduciendo la recurrencia en el 70% de los pacientes. A pesar de que todavía hay preguntas pendientes sobre su mecanismo de acción, está claro que tras la instilación de la micobacteria en la vejiga, se produce el reclutamiento de linfocitos y células mieloides, así como la liberación de citoquinas y quimioquinas. Se piensa que esta respuesta inmunitaria local es la que, en último término, será capaz de eliminar a las células tumorales.

Las células *Natural Killer* (NK) son linfocitos citotóxicos que participan en la respuesta inmunitaria frente al cáncer y a infecciones producidas por distintos patógenos. Además, existen datos que demuestran que las células NK contribuyen al éxito de la inmunoterapia con BCG.

En esta tesis, se han llevado, en paralelo, dos líneas de investigación para estudiar el papel de las células NK en la respuesta inmunitaria contra el cáncer de vejiga en el contexto del tratamiento con BCG: por un lado, se han realizado experimentos en un modelo *in vitro* y, por otro, se han analizado muestras de pacientes de cáncer de vejiga tratados con BCG.

*In vitro*, se ha estudiado el reconocimiento de distintas líneas celulares tumorales uroteliales por las células NK aisladas de sangre periférica de donantes sanos, así como la manera en la que BCG afecta a ese reconocimiento. Si bien la micobacteria no produce cambios en las células tumorales uroteliales que modulen la respuesta de las células NK estimuladas con IL-2, sí es capaz de producir la diferenciación de las células NK en presencia de otras células del sistema inmunitario. Así, la co-incubación de células de sangre periférica con BCG, genera una población de células NK CD56<sup>bright</sup> que, inesperadamente, expresa CD16, KIR y CD57 y que tiene una gran capacidad para responder frente a las células tumorales uroteliales. La expansión de esta nueva población de células NK, depende de la liberación de factores solubles producidos por otras células inmunitarias en respuesta a BCG.

Por su parte, el estudio de las muestras de sangre y orina de pacientes reveló que, aunque a nivel periférico parece difícil poder detectar cambios debidos al tratamiento con BCG, a nivel local es posible detectar factores solubles que se liberan, al menos una semana después de la instilación, y que pueden estar implicados en la eficacia de la respuesta al tratamiento.

La integración de ambos estudios ha permitido, a partir de los resultados obtenidos *in vitro*, proponer un modelo de la respuesta a la micobacteria, tanto a nivel celular como humoral, que puede verse reflejado en los factores solubles liberados en la orina de los pacientes. Se propone la realización de un estudio con un mayor número de pacientes que sería muy útil para, más adelante, poder determinar factores que permitan predecir la buena o mala respuesta de los pacientes en estadíos tempranos del tratamiento con BCG.

# **ABSTRACT**

*Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) has been used to treat non-muscle invasive bladder cancer (NMIBC) since 1976, reducing recurrence in about 70% of patients. Although there are still open questions about its mechanism of action, the instillation of the mycobacteria into the bladder is known to result in the recruitment of lymphocytes and myeloid cells, as well as the release of cytokines and chemokines, and it is thought that this local immune response plays an important role in the elimination of the tumour.

Natural Killer (NK) cells are cytotoxic lymphocytes important in immune responses against cancer and infections produced by different pathogens. Moreover, a variety of data from the literature strongly suggest that NK cells are important for the success of BCG immunotherapy.

In this thesis, the role of NK cells in the immune response against bladder cancer triggered by BCG has been analysed by establishing an *in vitro* model system, and by the analysis *ex vivo* of peripheral blood and urine from bladder cancer patients undergoing BCG therapy.

*In vitro*, the recognition of different bladder cancer cell lines by freshly isolated NK cells purified from healthy donors, as well as the effect of BCG on this recognition were studied. Although exposure to mycobacteria did not produce changes in the bladder tumour cells that modified their recognition by IL-2-activated NK cells, it was able to induce NK cell differentiation and activation in the presence of other immune cells. The co-incubation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with BCG led to the expansion of a CD56<sup>bright</sup> NK cell population that, surprisingly, expressed CD16, KIR and CD57, and that could respond to the different bladder cancer cells. The expansion of these NK cells depended on the release of soluble factors by other immune cells responding to BCG.

It proved difficult to detect significant changes in peripheral blood after intravesical instillation of BCG. However, the analysis, one week after BCG instillation, of the urine samples revealed the presence of a range of different soluble factors that could play a role in the efficacy of the response to the treatment.

Finally, comparison of the data obtained *in vitro* and *in vivo* has allowed establishment of a model of the humoral and cellular response to the mycobacteria, as reflected in the soluble factors released in the urine of BCG-treated patients. It will be interesting to study in detail the release of these soluble factors in a larger cohort of patients to test whether they are useful biomarkers to predict the response of patients to treatment with BCG at early stages of the therapy.

# **ABREVIATURAS**

<b>7-AAD</b>	7-amino actinomicina D
<b>ACT</b>	Transferencia Celular Adoptiva
<b>ADCC</b>	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
<b>ADN</b>	Ácido DesoxirriboNucleico
<b>AICL</b>	Del inglés, <i>Activation-Induced C-type Lectin</i>
<b>ANOVA</b>	Análisis de la Varianza
<b>APC</b>	Alofococianina
<b>APCs</b>	Células Presentadoras de Antígeno
<b>ARN</b>	Ácido RiboNucléico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>ATCC</b>	Del inglés, <i>American Type Culture Collection</i>
<b>BAK</b>	Del inglés, <i>BCG-Activated Killer cells</i>
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guérin
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino
<b>CAR</b>	Receptor quimérico de antígeno
<b>CD</b>	Del inglés, <i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CIS</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>CTLA-4</b>	Del inglés, <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
<b>d</b>	Días
<b>DMEM</b>	Del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>FAP</b>	Proteína de Adhesión a Fibronectina
<b>FasL</b>	Fas Ligando
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino
<b>Fc</b>	Fracción cristalizable de la inmunoglobulina
<b>FDA</b>	Del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>GAG</b>	Glicosaminoglicanos
<b>GM-CSF</b>	Del inglés, <i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>
<b>GRO-<math>\alpha</math></b>	Del inglés, <i>Growth Related Oncogen <math>\alpha</math></i>

<b>h</b>	horas
<b>HCMV</b>	Del inglés, <i>Human CytoMegalovirus</i>
<b>HIV</b>	Del inglés, <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
<b>HLA</b>	Antígeno Leucocitario Humano
<b>HS</b>	Suero Humano AB <sup>+</sup> masculino
<b>ICAM-1</b>	Del inglés, <i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IL-2R</b>	Receptor de IL-2
<b>IP-10</b>	Del inglés, <i>IFN-inducible Protein 10</i>
<b>ITIM</b>	Del inglés, <i>Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif</i>
<b>KACL</b>	Del inglés, <i>Keratinocyte-Associated C-type Lectin</i>
<b>KIR</b>	Del inglés, <i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors</i>
<b>KO</b>	Del inglés, <i>Knock Out</i>
<b>L-Gln</b>	L-Glutamina
<b>LAK</b>	Del inglés, <i>Lymphokine-Activated Killer (cells)</i>
<b>LAMP-1</b>	Del inglés, <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein-1</i>
<b>LFA-1</b>	Del inglés, <i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
<b>MEM</b>	Del inglés, <i>Minimum Essential Medium</i>
<b>MFI</b>	Intensidad Media de Fluorescencia
<b>MHC</b>	Complejo Principal de Histocompatibilidad
<b>MIC</b>	Del inglés, <i>MHC class-I-related Chain</i>
<b>min</b>	minutos
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Del inglés, <i>Macrophage Inflammatory Protein 1<math>\alpha</math></i>
<b>MMC</b>	Mitomicina C
<b>n.s.</b>	no significativo
<b>NCAM1</b>	Del inglés, <i>Neural Cell Adhesion Molecule 1</i>
<b>NCR</b>	Del inglés, <i>Natural Cytotoxicity Receptor</i>
<b>NK</b>	Del inglés, <i>Natural Killer</i>

<b>NKG2</b>	Del inglés, <i>Natural Killer Group 2</i>
<b>NKT</b>	Del inglés, <i>Natural Killer T cell</i>
<b>NMIBC</b>	Del inglés, <i>Non-Muscle Invasive Bladder Cancer</i>
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>p</b>	p-valor
<b>PBA</b>	PBS-BSA-Azida sódica
<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PC5</b>	PE-Cy5
<b>PC7</b>	PE-Cy7
<b>PD-1</b>	Del inglés, <i>Programmed cell death 1</i>
<b>PD-1L</b>	Ligando de PD-1
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PFA</b>	para-formaldehído
<b>PMA</b>	Forbol 12-miristato 13-acetato
<b>PVR</b>	Receptor del Poliovirus
<b>rhIL</b>	Interleuquina humana recombinante
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Del inglés, <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
<b>RTX</b>	Rituximab
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SEM</b>	Desviación estándar de la media
<b>TAMs</b>	Del inglés, <i>Tumor-Associated Macrophages</i>
<b>TCC</b>	Carcinoma de células transicionales
<b>TLR</b>	Del inglés, <i>Toll-Like Receptor</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$
<b>TNM</b>	Del inglés, <i>Tumor, Node and Metastasis</i>
<b>TRAIL</b>	Del inglés, <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>
<b>TUR</b>	Resección trans-uretral



<b>ULBP</b>	Del inglés, <i>UL-16 Binding Protein</i>
<b>VCAM</b>	Del inglés, <i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>

# INTRODUCCIÓN

## 1. SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER

En 1863, el Dr. Rudolf Virchow, considerado “padre de la patología moderna”, describió por primera vez la presencia de leucocitos en tumores y, basándose en estas observaciones, propuso que la inflamación crónica generada como consecuencia de infecciones bacterianas podía provocar la aparición de tumores (Balkwill and Mantovani 2001). A partir de entonces, numerosos estudios han contribuido a la aceptación del importante papel de la inflamación en la tumorigénesis, culminando en 2009, con la publicación de la revisión “*Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer*” por Colotta y sus colaboradores. En ella, se resaltan las evidencias que relacionan inflamación y tumorigénesis a través de dos vías diferentes que, a su vez, están conectadas: la vía intrínseca, en la que los eventos genéticos causantes de las neoplasias inician la expresión de programas que promueven la generación de un microambiente inflamatorio, y la vía extrínseca, en la que las condiciones inflamatorias, a consecuencia, por ejemplo, de una infección o una enfermedad autoinmune, son capaces de promover el desarrollo del tumor (Colotta et al. 2009).

La relación entre inflamación y cáncer causó mucha controversia en la comunidad científica desde 1863, ya que no todos los científicos apoyaban la teoría de que el sistema inmunitario contribuyera más a la tumorigénesis que a la eliminación de tumores. En 1891, William B. Coley utilizó una preparación de *Streptococcus* en un paciente con sarcoma óseo terminal confiando en que la respuesta inmunitaria frente a la erisipela provocase, como efecto secundario, la eliminación del tumor. Y, finalmente, este tratamiento funcionó en ese paciente. Se ha propuesto que éste podría ser el primer caso de inmunoterapia exitosa (McCarthy 2006), aunque por aquel entonces no se sabía lo importante que llegaría a ser la inmunoterapia en nuestros días. Coley, continuó utilizando estos preparados que, tras disminuir su virulencia, se pasaron a denominar “Toxina de Coley”. Sin embargo, posteriormente se comprobó que la tasa de éxito de esta “toxina de Coley” era de apenas un 10% (Wiemann and Starnes 1994), lo que volvió a generar bastante controversia en el campo.

En los años siguientes, se debatió mucho acerca de la importancia del sistema inmunitario en la eliminación de tumores, pero no fue hasta 1967, cuando F. M. Burnet propuso formalmente la teoría de la inmunovigilancia o “cancer immunosurveillance”, que más tarde fue apoyada también por L. Thomas (Burnet 1967; Burnet 1970; Thomas 1982). Según ésta, el hecho de que, a pesar de la alta tasa de mutación, sean pocos los tumores que se llegan a desarrollar, se podría explicar por la expresión de antígenos extraños en las células tumorales que podrían ser reconocidos por las células T. Sin embargo, datos obtenidos en los años posteriores pusieron en entredicho esta teoría, entre otros motivos, porque por aquel entonces no se conocían todos los defectos inmunitarios de los ratones *nude* que se utilizaban en aquellos primeros experimentos, así como la existencia de muchos linajes celulares que se describieron posteriormente, como las células NK o las células  $T\gamma\delta$  (Rygaard and Povlsen 1974b; Rygaard and Povlsen 1974a; Stutman 1974).

Desde entonces, y hasta el año 2002, la teoría de la inmunovigilancia se fue desarrollando hasta que se vio que sus postulados sólo comprendían una de las dimensiones de la relación entre el sistema inmunitario y el cáncer. Fue Robert Schreiber quien, en 2002, postuló la teoría del inmunomodelado o “immunoediting” (Dunn et al. 2002). Según esta teoría, la relación entre el sistema inmunitario y el cáncer sería un proceso dinámico en el que, cuando el primero es incapaz de eliminar el tumor por completo, la eliminación de las variantes tumorales más inmunogénicas favorecería la expansión de otras variantes tumorales menos inmunogénicas.

Así, tras más de un siglo de investigación, sabemos que ambas ideas tenían su parte de razón. Por una parte, la inflamación crónica es capaz de producir alteraciones en las células que podrían desembocar en el desarrollo de un tumor. Pero a su vez, las células del sistema inmunitario son capaces de reconocer aquellas células del organismo que ha sufrido cambios a consecuencia de una transformación tumoral y eliminarlas. Sin embargo, las células que escapan de esta vigilancia inmunológica, son capaces de dar lugar a un tumor.

### 1.1. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER

---

La inmunoterapia pretende activar el sistema inmunitario con el fin de que sea capaz de reconocer a las células tumorales que, inicialmente, fueron capaces de escapar de la vigilancia inmunológica. Esta activación se puede conseguir de diferentes formas: a través de mecanismos inespecíficos, como el uso de la toxina de Coley, BCG (Bacilo Calmette-Guérin), IL-2 o IFN $\gamma$ ; o a través de mecanismos específicos, como por ejemplo la transferencia celular adoptiva o la inmunomodulación con anticuerpos monoclonales.

La transferencia celular adoptiva o ACT (del inglés “*Adoptive Cell Transfer*”) se basa en la expansión y manipulación *ex vivo* de células citotóxicas del propio paciente que, posteriormente, son transferidas de nuevo al paciente (Rosenberg and Restifo 2015). En la actualidad se ha puesto mucho interés en la creación de células T con un receptor quimérico de antígeno o CAR (del inglés “*Chimeric Antigen Receptor*”) que, debido a su estructura, es capaz de reconocer de manera específica a su ligando en la superficie de las células tumorales y, sin necesidad de otras señales co-estimuladoras, desencadenar una respuesta citotóxica frente a ellas.

Por otra parte, la inmunomodulación con anticuerpos monoclonales se empezó a utilizar en clínica en 1997 tras la aprobación del uso de Rituximab (específico para la molécula CD20) por la FDA (del inglés “*Food and Drug Administration*”) de EEUU para los linfomas de células B (Grillo-López et al. 2000). A pesar de que se siguen utilizando anticuerpos dirigidos contra las células tumorales, la utilización de anticuerpos específicos para los puntos de control inmunológicos o “immune checkpoints” de las células del sistema inmunitario están dando muy buenos resultados en pacientes con diversos tipos de tumores, como pueden ser melanoma o cáncer de pulmón. Se ha profundizado poco todavía en el mecanismo de acción de estas

terapias, aunque se ha propuesto que el bloqueo de estos receptores inhibidores, tales como CTLA-4 (del inglés “*Cytotoxic-T Lymphocyte Antigen 4*”) o PD-1 (del inglés “*Programmed cell Death 1*”), favorece una mayor respuesta por parte de las células T y NK frente a las células tumorales (revisado en (Khalil et al. 2016)).

Además de estas terapias dirigidas, las inmunoterapias con citoquinas u otros factores “inespecíficos” también han demostrado dar muy buenos resultados y se utilizan actualmente en la clínica. En concreto, la inmunoterapia con BCG para el cáncer de vejiga, que se empezó a utilizar hace ya 40 años, ha demostrado ser muy eficiente en la reducción de la recurrencia de tumores, mejorando el pronóstico en estos pacientes, por lo que se sigue utilizando actualmente.

## 1.2. INMUNOTERAPIA CON BCG

A partir de los resultados de William Coley con la erisipela, otros investigadores empezaron a estudiar el posible efecto de la utilización de una bacteria como agente inmunoestimulador frente al cáncer. Poco tiempo después de la publicación de los resultados de W. Coley, entre 1908 y 1919, Albert Calmette y Camille Guérin, desarrollaron la vacuna de la tuberculosis, también conocida como BCG o Bacilo Calmette-Guérin, generando una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* que no producía la enfermedad en humanos, mediante su cultivo *in vitro* durante 15 años. A pesar de la controversia que aún existe sobre la eficacia de esta vacuna en la prevención de la tuberculosis, pocos años después se descubrió que su uso podría ser muy importante como agente antitumoral.

En 1929, R. Pearl describió, por primera vez, el posible papel antineoplásico de las micobacterias tras darse cuenta de que había una menor tasa de cáncer de pulmón en los pacientes fallecidos por tuberculosis, en comparación con los que fallecían por otras causas (Pearl 1929; Harikrishna et al. 2012). Sin embargo, hasta el desarrollo de los modelos animales, en los años 50, no se volvió a pensar en la posibilidad de utilizar la vacuna de la tuberculosis como agente antitumoral. Ya en 1959, L. Old describió el papel antitumoral de BCG en ratones (Old et al. 1959), pero no fue hasta 10 años después cuando se publicaron los primeros resultados de inmunoterapia con BCG en humanos. G. Mathé describió remisiones prolongadas en pacientes con leucemia linfoblástica aguda tras el uso de BCG como tratamiento adyuvante (Mathé et al. 1969) y, al año siguiente, D. Morton describió que, tras la inyección directa de BCG en tumores y ganglios de pacientes con melanoma o sarcoma, se producían remisiones de ambos tipos de tumores (Morton et al. 1970).

En 1974, B. Zbar y H. J. Rapp, utilizando un modelo de cobaya, establecieron las condiciones para conseguir un efecto antitumoral óptimo con el tratamiento con BCG: este tratamiento se debía aplicar en pacientes con capacidad para desarrollar una respuesta inmunitaria adecuada,

cuya carga tumoral no fuese muy elevada y estuviera localizada, de tal forma que, utilizando un determinado número de bacilos vivos, se permitiese el contacto entre las células tumorales y la bacteria (Zbar and Rapp 1974). Estas condiciones se cumplen a la perfección en el caso del cáncer de vejiga.

Dos años después, J. A. Martínez-Piñeiro, urólogo español, y A. Morales, canadiense, publicaron casi en paralelo los resultados obtenidos tras el uso de BCG en el tratamiento de carcinomas vesicales. Martínez-Piñeiro comparó la respuesta al tratamiento con BCG cuando se aplicaba como escarificaciones en la espalda o como inyección intratumoral, dando mejores resultados esta última (Martínez-Piñeiro and Muntañola 1977). Por su parte, Morales demostró la efectividad de la instilación de la micobacteria en la vejiga de 9 pacientes con cáncer de vejiga superficial (Morales et al. 1976). El calendario de instilaciones que Morales utilizó de manera totalmente empírica se sigue utilizando hasta nuestros días.

Numerosos estudios posteriores han demostrado que la eficacia del tratamiento con BCG es superior a la del tratamiento con agentes quimioterapéuticos (Sylvester et al. 2002; Böhle et al. 2003; Jiang et al. 2016), lo que lo ha convertido en el tratamiento estándar frente al cáncer de vejiga superficial.

## 2. EL CÁNCER DE VEJIGA

---

### 2.1. INCIDENCIA, MORTALIDAD Y FACTORES DE RIESGO EN EL CÁNCER DE VEJIGA

---

En España, el cáncer de vejiga tiene una alta tasa de incidencia, ocupando el 4º puesto como cáncer más frecuente en hombres y el 15º en mujeres. Sin embargo, a pesar de que la tasa de incidencia es equivalente a la europea, su mortalidad en España se sitúa por encima de la media de Europa. Además, la media de edad a la que se diagnostica este tipo de cáncer es a los 65 años, por lo que afecta, en general, a personas de edad avanzada (Ferlay et al. 2013).

Mientras que en los países desarrollados, el principal factor de riesgo identificado en el cáncer de vejiga es el tabaco, en los países en vías de desarrollo, en torno al 50% de los tumores de vejiga se producen por la adquisición del parásito *Schistosoma haematobium*, asociada a la ingesta de aguas contaminadas (Parkin 2006; Parkin 2008), aunque la histología de estos tumores suele ser distinta (Torre et al. 2015).

### 2.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE VEJIGA

---

#### 2.2.1. Clasificación histológica

---

Según su histología, se pueden distinguir cinco tipos de cáncer de vejiga (Mostofi et al.

1973; MacLennan et al. 2007):

- Carcinoma de células transicionales (TCC): también conocido como “carcinoma urotelial”, representa más del 97% de los tumores de vejiga. Se pueden distinguir dos tipos de TCC:
  - Tumores papilares: las células tumorales forman digitaciones a partir de las capas más superficiales de la vejiga que se proyectan hacia el interior de la misma, por lo que, inicialmente, se trata de tumores no músculo-invasivos. Sin embargo, dado que suelen estar formados por células tumorales muy desdiferenciadas, pueden invadir rápidamente capas más profundas de la vejiga convirtiéndose en tumores invasivos.
  - Carcinomas planos: también conocidos como “Carcinoma *In Situ*” (CIS), representan el 10% de los carcinomas de células transicionales. Las células tumorales se limitan a la capa superficial de células uroteliales, sin proliferar ni hacia el interior de la vejiga ni hacia las capas más profundas de la misma. Al igual que ocurría con los tumores papilares, las células tumorales suelen estar muy desdiferenciadas, por lo que rápidamente pueden convertirse en tumores invasivos.
- Carcinoma de células escamosas: representa un 1-2% de los tumores de vejiga. Suelen ser tumores invasivos que se desarrollan a partir de células escamosas, las cuales aparecen en la vejiga tras sufrir algún tipo de irritación, como por ejemplo una infección.
- Adenocarcinoma: representa un 1% de los tumores de vejiga. Suelen ser tumores invasivos que se desarrollan a partir de células glandulares del revestimiento de la vejiga.
- Carcinoma de células pequeñas: representan menos de un 1% de los tumores de vejiga. Suelen ser tumores muy agresivos.
- Sarcoma: estos tumores empiezan en las células musculares de la vejiga, aunque en general son muy raros.

| 35

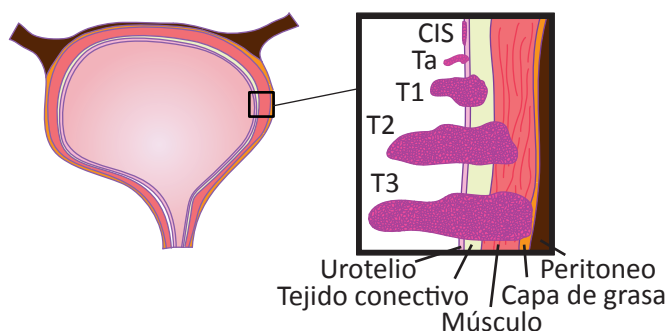
### 2.2.2. Clasificación TNM

En clínica, se suele utilizar la clasificación TNM (del inglés “*Tumor, Nodes and Metastasis*”), que clasifica los tumores en función de cómo sea el tumor primario (T), de si hay nódulos linfáticos afectados (N) y de si hay metástasis (M) (Di Pierro et al. 2012; Babjuk et al. 2013).

Así, los estadíos T (*figura 1*) incluyen:

- Tis o CIS (carcinoma *in situ*): carcinoma plano de alto grado que sólo invade el urotelio, sin crecer hacia el interior de la vejiga.
- Ta: tumor papilar que solamente afecta al urotelio.
- T1: tumor papilar que invade el tejido conectivo subyacente al urotelio.

- T2: tumor que invade la capa muscular tras atravesar el tejido conectivo de la vejiga.
- T3: tumor que invade la capa de grasa tras haber atravesado la capa muscular de la vejiga.
- T4: el cáncer se disemina fuera de la vejiga.



**Figura 1.** Clasificación de los tumores uroteliales en función del estadio T (clasificación TNM).

Según esta clasificación, se denomina “cáncer de vejiga no músculo-invasivo” (NMIBC, del inglés *“Non-Muscle Invasive Bladder Cancer”*), también conocido como “cáncer de vejiga superficial”, aquel perteneciente a los estadios CIS, Ta y T1.

La clasificación según la afectación de nódulos linfáticos (N) incluye: N0 si no hay nódulos linfáticos afectados, N1 si hay un nódulo linfático afectado en la pelvis, N2 si hay más de un nódulo linfático afectado en la pelvis, y N3 si hay uno o más nódulos linfáticos afectados en la ingle.

Por último, la clasificación M incluye: M0 si el tumor no ha metastatizado, es decir, no se ha diseminado a otros órganos del cuerpo, o M1 si lo ha hecho.

### 2.2.3. Clasificación según el grado de diferenciación

En 1973, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso otra clasificación para los tumores de vejiga no músculo-invasivos, basada en el grado de diferenciación de las células tumorales (Mostofi et al. 1973; MacLennan et al. 2007; Chen et al. 2012). Así, serán de “grado 1” o “bajo grado” aquellos tumores cuyas células estén bien diferenciadas, con una tasa de crecimiento lenta y con poca capacidad de diseminación. En el lado opuesto, serán de “grado 3” o “alto grado” aquellos tumores cuyas células estén muy desdiferenciadas, las cuales tendrán una mayor capacidad de crecimiento y diseminación, como es el caso de las células tumorales en los CIS.

Tanto el estadio T como el grado de diferenciación del tumor son muy importantes en la elección del tratamiento a aplicar.

## 2.3. TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE VEJIGA SUPERFICIAL

En el caso de los tumores papilares, el tratamiento estándar consiste en la resección trans-uretral o TUR (del inglés *“Trans-Urethral Resection”*) de estos tumores. Sin embargo, cuando sólo se aplica la resección trans-uretral, el 70% de los tumores no músculo-invasivos muestran



recurrencia y suelen progresar rápidamente hacia un tumor músculo-invasivo (Böhle et al. 2003; Jiang et al. 2016). Con el objetivo de reducir el riesgo de recurrencia de estos tumores tras la resección trans-uretral, es recomendable la aplicación de tratamientos adyuvantes como la quimioterapia (mitomicina C) o la inmunoterapia (BCG).

En el caso de los carcinomas planos, donde la resección trans-uretral no es posible, el tratamiento consiste, directamente, en la aplicación de agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos. La administración de estos agentes directamente en la vejiga favorece la buena respuesta al tratamiento ya que se pueden aplicar altas concentraciones del agente quimioterapéutico o inmunoterapéutico prácticamente sobre el tumor, disminuyendo el riesgo que supone un tratamiento a nivel sistémico.

### 2.3.1. Instilación intravesical de BCG

Para el cáncer de vejiga no músculo-invasivo (CIS, Ta o T1) de grado 2 ó 3, el tratamiento estándar tras la resección trans-uretral, en el caso de que sea posible, consiste en la instilación de BCG en la vejiga de los pacientes, ya que se ha visto que su eficacia es superior a la de distintos agentes quimioterapéuticos, entre ellos la mitomicina C (Kurth et al. 2000; Jiang et al. 2016).

| 37

### 2.3.2. Instilación intravesical de mitomicina C

En aquellos pacientes que desarrollan efectos secundarios o presentan recurrencia tras el tratamiento con BCG, así como en pacientes que tienen tumores de bajo grado, tras la resección trans-uretral, se aplica la mitomicina C, la cual ha demostrado disminuir el riesgo de recurrencia del tumor en comparación con la resección trans-uretral sola (Tolley et al. 1988).

## 3. INMUNOTERAPIA CON BCG EN EL CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO-INVASIVO

Como ya se mencionó anteriormente, la inmunoterapia con BCG ha demostrado ser más efectiva que otras terapias alternativas en cuanto a la reducción en la recurrencia de tumores y a la supervivencia en 5 años (Bassi 2002; Böhle et al. 2003).

### 3.1. BACILO CALMETTE-GUÉRIN O BCG

BCG es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*, perteneciente a la familia de las micobacterias. El primer ensayo clínico exitoso en humanos en el que se utilizó esta micobacteria tuvo lugar en 1921 (Calmette 1922; Luca and Mihaescu 2013). Desde ese año,

la vacuna BCG, desarrollada por Albert Calmette y Camille Guérin, se distribuyó a distintos laboratorios del mundo. El hecho de que hasta los años 60 no se empezase a distribuir en lotes liofilizados, provocó que, durante 40 años, distintos grupos mantuvieran la cepa inicial de BCG a través de pases sucesivos en paralelo. Debido a esto, se fueron acumulando mutaciones que finalmente dieron lugar a cepas diferentes a la cepa original, la cepa Pasteur (Herr and Morales 2008). Actualmente, las cepas BCG Connaught y BCG Tice son las cepas más utilizadas para el tratamiento de cáncer de vejiga en Europa y América del Norte (Rentsch et al. 2014), en ocasiones también se utilizan otras cepas como BCG Danish o BCG Tokyo.

### 3.2. CALENDARIO DE TRATAMIENTO

---

A pesar de que Morales no publicó sus resultados hasta 1976 (Morales et al. 1976), ideó el protocolo original para el tratamiento de los tumores vesicales con BCG en 1972. Por aquel entonces, la cepa de la que disponía era BCG Frappier, la cual se encontraba liofilizada en viales de 120 mg. Tras comprobar la tolerancia en escarificaciones intradérmicas, decidió instilar esa cantidad de vacuna diluida en 50 ml de una solución salina en la vejiga de los pacientes. Además, ya que la cepa BCG Frappier se distribuía en cajas de 6 viales separados, pensó que una instilación semanal durante 6 semanas, sería suficiente para inducir una respuesta inmunitaria adecuada (Herr and Morales 2008).

Aunque inicialmente se aplicó el tratamiento según lo inició Morales, a día de hoy, hay cierta controversia en cuanto a la dosis que se debe utilizar, la cual se ha reducido de aquellos 120 mg/vial de la cepa BCG Frappier hasta 81 mg/vial en el caso de la cepa BCG Connaught (ImmuCyst, Sanofi Pasteur) y hasta 12,5 mg/vial en el caso de la cepa BCG Tice (OncoTICE, Merck Canada Ink.), a pesar de que las unidades formadoras de colonias no son estrictamente proporcionales al contenido en peso de los viales. De igual manera, la frecuencia de las instilaciones y la duración del tratamiento también han generado cierta controversia ya que, tras la terapia de inducción inicial, se puede aumentar la eficacia del tratamiento con la aplicación de una terapia de mantenimiento que, en general, supone ciclos cortos de 2-3 instilaciones cada 3-6 meses hasta completar 3 años. Todos estos factores todavía son objeto de ensayos clínicos (Lamm et al. 2000; Martínez-Piñeiro et al. 2015).

En cualquier caso, desde la publicación de los resultados de Morales y sus colaboradores (Morales et al. 1976), numerosos estudios han demostrado que la instilación intravesical de BCG era capaz, no sólo de erradicar el CIS, sino también de retrasar la progresión hacia un tumor músculo-invasivo, así como de aumentar la supervivencia en pacientes con cáncer de vejiga superficial de alto riesgo, demostrando una eficacia superior a la quimioterapia intravesical (Shelley et al. 2001; Sylvester et al. 2002; Jiang et al. 2016). Finalmente, en 1990, la FDA aprobó este tratamiento para su uso en CIS y más tarde, en 1998, lo aprobó para su uso en tumores papilares (Herr and Morales 2008), convirtiéndose así en el tratamiento estándar

para el cáncer de vejiga superficial hasta nuestros días.

### 3.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA INMUNOTERAPIA CON BCG

La inmunoterapia con BCG se lleva utilizando desde hace casi 40 años. Sin embargo, todavía hay preguntas pendientes sobre su mecanismo de acción. Numerosos grupos han centrado sus esfuerzos en su estudio ya que, a pesar de que la inmunoterapia con BCG tiene una alta tasa de éxito, con un 70% de los pacientes que no presenta recurrencia tras 5 años, también tiene una alta tasa de abandono del tratamiento, mayor que la de la quimioterapia, debido a los efectos secundarios derivados de la exposición a la micobacteria, tanto a nivel local como a nivel sistémico (Sylvester 2011). Por tanto, el conocimiento del mecanismo de acción sería de gran utilidad para determinar si los pacientes están respondiendo a la terapia, así como para identificar a aquellos pacientes que no vayan a responder a ella en un estadio temprano de la enfermedad de tal forma que se pudiese aplicar otra terapia alternativa a tiempo.

Se sabe que la actividad anti-tumoral de la inmunoterapia con BCG se basa, principalmente, en una reacción inflamatoria que conlleva el reclutamiento de distintas poblaciones inmunitarias a la vejiga, así como la secreción de citoquinas y quimioquinas. Sin embargo, para que la micobacteria pueda llevar a cabo su función, es necesario que se acumule y adhiera a la pared de la vejiga (Alexandroff et al. 1999; Brandau and Suttman 2007; Redelman-Sidi et al. 2014). Por tanto, el efecto producido por el contacto de la micobacteria con las células tumorales uroteliales y con las células del sistema inmunitario, desempeñará un papel en todo este sistema.

| 39

#### 3.3.1. BCG y las células uroteliales

La unión de BCG a las células uroteliales se puede producir tanto por interacciones no específicas, como puede ser diferencia de carga, como por interacciones específicas, a través de la proteína de adhesión a fibronectina o FAP (del inglés "*Fibronectin Attachment Protein*") de la micobacteria. Se ha descrito que, *in vitro*, se produce la internalización de la micobacteria específicamente en las células tumorales (Durek et al. 1999). Además, las células más desdiferenciadas tienen una mayor capacidad para internalizar BCG (Bever et al. 1998), lo que podría explicar el hecho de que el tratamiento sea más eficaz en pacientes con tumores de alto grado. La internalización de la micobacteria provoca un aumento en la liberación de citoquinas, tales como interleuquina 6 (IL-6), IL-8, factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos o GM-CSF (del inglés "*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*") y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  o TNF- $\alpha$  (del inglés "*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ") que, a su vez, promueven el reclutamiento de células del sistema inmunitario a la vejiga (Esvaranathan et al. 1995; Bever et al. 1998; Zhang et al. 1999). Además, una vez internalizada, la micobacteria

también puede ejercer un efecto citotóxico directo sobre las células uroteliales reduciendo la tasa de proliferación (Jackson et al. 1994; Durek et al. 1999) e, incluso, induciendo la muerte de estas células tumorales (Bever et al. 2004; Pook et al. 2007), provocando así una mayor respuesta por parte de las células del sistema inmunitario (Sandes et al. 2007).

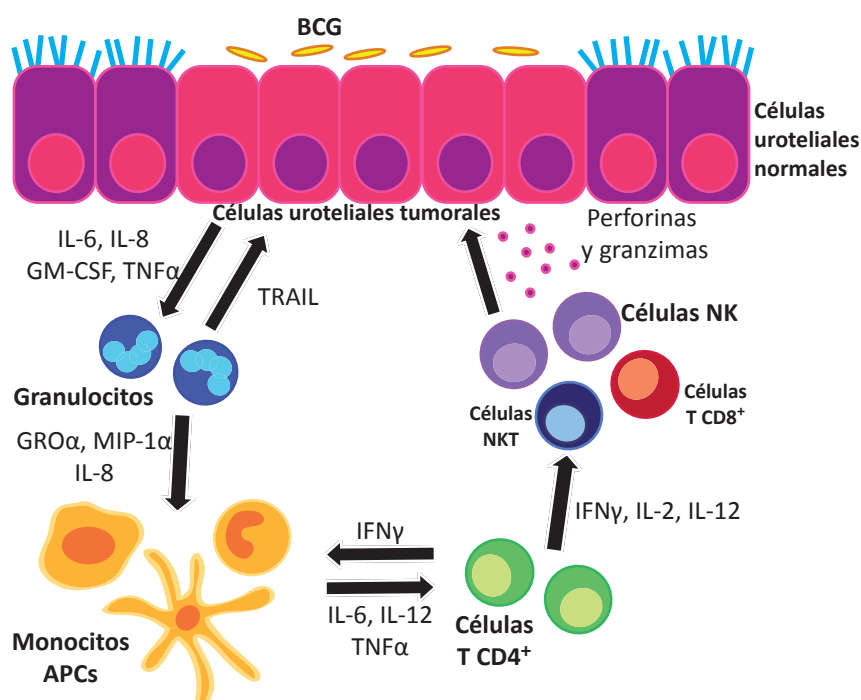
### 3.3.2. BCG y las células del sistema inmunitario

Tras la instilación de la micobacteria, se produce un reclutamiento de células del sistema inmunitario a la vejiga de los pacientes (Böhle et al. 1990), que se ve reflejado también en un aumento de estas células (De Boer et al. 1991), así como de factores solubles (Bisiaux et al. 2009; Zuiverloon et al. 2012) en la orina de los pacientes.

El patrón de factores solubles detectado en la orina de estos pacientes orienta sobre el tipo de respuesta que se produce en la vejiga tras el tratamiento con BCG. Así, el hecho de que se detecten citoquinas como IL-2, IL-12 e interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) y, a su vez, no se detecte IL-4 ni IL-10 a tiempos cortos tras la instilación de la micobacteria en los pacientes “respondedores” al tratamiento, apunta hacia el desarrollo de una respuesta tipo Th1. De hecho, se ha descrito que la respuesta Th1 es necesaria para el éxito de esta terapia (Luo et al. 2003).

En base a esto, numerosos grupos de investigación han centrado sus estudios en el efecto que BCG tiene sobre las diferentes poblaciones celulares implicadas en una respuesta tipo Th1 y que han revelado cierta importancia en este sistema (*figura 2*).

El hecho de que también haya un importante reclutamiento inicial de neutrófilos a la



**Figura 2.** Esquema modelo del mecanismo de acción propuesto hasta la fecha para la inmunoterapia con BCG.

vejiga después de la instilación, hace pensar que estas células son las primeras que van a responder frente a BCG. En neutrófilos purificados de las orinas de los pacientes, así como cuando estas células son estimuladas *in vitro* con BCG, se produce un aumento de la expresión del ligando regulador de apoptosis de la familia del TNF o TRAIL (del inglés "*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*"), que es capaz de inducir apoptosis de manera selectiva en las células tumorales pero no en las células normales (Kemp et al. 2005; Rosevear et al. 2009). Por otra parte, se ha visto que la estimulación *in vitro* de estas células con BCG, tanto purificadas a partir de células de sangre periférica como de la orina de los pacientes tratados con BCG, favorece la producción de factores solubles tales como IL-8, GRO- $\alpha$  (del inglés "*Growth-Related Oncogene  $\alpha$* ") y MIP-1 $\alpha$  (del inglés "*Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$* "). Estos factores solubles son importantes en el reclutamiento de células presentadoras de antígeno o APCs (del inglés "*Antigen Presenting Cells*") y, de manera indirecta, favorecen el reclutamiento de células citotóxicas. Además, los niveles elevados de IL-8, entre otros, se han asociado con una buena respuesta al tratamiento (Suttmann et al. 2006).

Junto con los macrófagos residentes en la vejiga, el reclutamiento de APCs también favorece que haya una respuesta eficaz en la inmunoterapia con BCG. De hecho, se ha visto un aumento de estas células tanto en biopsias de vejiga (Prescott et al. 1992) como en la orina de los pacientes con el tratamiento (De Boer et al. 1991; Beatty et al. 2004). A pesar de no haber apenas datos sobre la función de los macrófagos en ensayos *in vivo*, *in vitro* se ha visto que cuando son estimulados con BCG producen IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , citoquinas relacionadas con la polarización de los macrófagos hacia macrófagos clásicos o M1, asociados con la respuesta Th1 que se requiere para el éxito de la terapia con BCG (Atkinson et al. 2000; Wang et al. 2000). Además, el hecho de que la detección en los tumores de un alto número de macrófagos asociados al tumor o TAMs (del inglés "*Tumour-Associated Macrophages*"), caracterizados como macrófagos alternativos o M2, sea considerado como marcador de mala respuesta al tratamiento, apoyaría la necesidad de que se produzca una diferenciación hacia macrófagos tipo M1, asociada a la respuesta Th1, para el éxito de la inmunoterapia con BCG (Allavena et al. 2008; Takayama et al. 2009).

Además de la respuesta mediada por citoquinas, tanto los macrófagos como las células dendríticas son capaces de presentar antígenos de BCG en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II o MHC-II (del inglés "*Major Histocompatibility Complex-II*"), activando así a las células T CD4<sup>+</sup>. Pero no sólo las APCs pueden presentar antígenos a las células T CD4<sup>+</sup>, también se ha descrito que la expresión de MHC-II aumenta en las células uroteliales a lo largo del tratamiento (Prescott et al. 1989). En un modelo murino, se ha demostrado que estas células también son capaces de presentar esos antígenos en moléculas MHC-II, provocando una activación de las células T CD4<sup>+</sup> similar a la producida por las APCs (Lattime et al. 1992).

La activación de las células T CD4<sup>+</sup> es muy importante en la buena respuesta al tratamiento

con BCG. De hecho, durante el tratamiento, se ha visto un reclutamiento importante de células T CD4<sup>+</sup> a la vejiga de los pacientes (Böhle et al. 1990; Boccafroschi et al. 1992; Prescott et al. 1992) y, a su vez, estas células representan una parte importante de los linfocitos que se encuentran en la orina de los pacientes (De Boer et al. 1991). Además, las citoquinas descritas hasta el momento, tanto las producidas en respuesta a BCG *in vitro* como las detectadas en la orina de los pacientes que responden al tratamiento, están involucradas en la polarización de las células T CD4<sup>+</sup> de Th2 a Th1, la cual es necesaria para obtener una respuesta anti-tumoral efectiva (Luo et al. 2003).

La respuesta Th1, o respuesta de inmunidad celular, tiene como consecuencia la producción de más factores solubles, como IFN- $\gamma$ , IL-2 o IL-12. Estas citoquinas también favorecen el reclutamiento y la activación de las células citotóxicas (O'Donnell et al. 1999; Riemensberger et al. 2002; Luo et al. 2003). Datos en la literatura apuntan a que las células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, probablemente células NKT, y, principalmente, las células NK son las células citotóxicas que desempeñan un papel más importante en la eliminación de las células tumorales tras la estimulación *in vitro* con BCG (Brandau et al. 2001; Higuchi et al. 2009; Della Chiesa et al. 2014).

### 3.3.3. BCG y las células NK

42 |

Las citoquinas descritas hasta el momento, detectadas tanto en la orina de los pacientes tratados como tras la estimulación con BCG *in vitro* de las diferentes poblaciones celulares estudiadas, son típicas de una respuesta Th1, necesaria para la buena respuesta a esta inmunoterapia, que no sólo favorece la respuesta de las células T, sino que también es muy importante para la activación de las células NK. En base a esto, otros investigadores se centraron en el estudio del papel que esta población citotóxica desempeña en el éxito de la inmunoterapia con BCG para el cáncer de vejiga.

En ensayos *in vitro*, se había observado que la estimulación con BCG de células mononucleares de sangre periférica o PBMCs (del inglés "*Peripheral Blood Mononuclear Cells*") durante varios días generaba una población de células citotóxicas activadas por BCG o células BAK (del inglés "*BCG-Activated Killer cells*") que tenían una mayor capacidad citotóxica frente a diferentes líneas uroteliales de vejiga (Thanhäuser et al. 1993; Böhle et al. 1993). Cuando se separaron las diferentes poblaciones celulares en estas células BAK según su expresión de CD3 y CD56 y se enfrentaron, por separado, a la línea tumoral urotelial T24, se comprobó que la población CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, es decir, la población de células NK, era la más citotóxica, al tiempo que la población CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> también contribuía, aunque en menor medida, a esa citotoxicidad. Sin embargo, las poblaciones CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> y CD3<sup>-</sup>CD56<sup>-</sup> no eran citotóxicas frente a T24 (Brandau et al. 2001). Además, para la generación de estas células BAK, era muy importante que previamente se hubiera producido IFN- $\gamma$  e IL-2 en el cultivo en respuesta a la BCG ya que,

cuando se bloqueaban estas citoquinas en los cultivos, la citotoxicidad de las células BAK disminuía considerablemente (Thanhäuser et al. 1993; Böhle et al. 1994; Thanhäuser et al. 1995).

La importancia de las células NK en la respuesta a la inmunoterapia con BCG se comprobó también *in vivo*. Así, utilizando un modelo de ratón en el que se implantaban tumores de vejiga ortotópicos en ratones silvestres o *wild-type*, se observó cómo el tratamiento con BCG aumentaba el reclutamiento de células NK a la vejiga (Brandau et al. 2001; Riemensberger et al. 2002). Además, la supervivencia de estos ratones *wild-type* aumentaba cuando se les aplicaba la inmunoterapia con BCG. Sin embargo, cuando la inmunoterapia con BCG se aplicaba en ratones *beige*, deficientes en la respuesta citotóxica y, por tanto, también en la respuesta de las células NK, no había diferencias entre la supervivencia de los ratones tratados con BCG y la de los ratones sin tratar (Brandau and Böhle 2001; Brandau et al. 2001). Además, en inmunohistoquímica de biopsias de pacientes, se observó un aumento de perforina, que es el mecanismo principal por el que estas células efectoras lisan a sus células diana (van den Broek et al. 1995; Brandau et al. 2000; Waterhouse and Trapani 2002).

Los factores solubles relacionados con la respuesta tipo Th1, que habían demostrado ser importantes para la activación *in vitro* de las células NK en respuesta a BCG, también demostraron ser importantes *in vivo*. De esta forma, ratones deficientes o KO (del inglés “*Knock-Out*”) para IL-12 o IFN- $\gamma$ , no sólo tenían una menor respuesta anti-tumoral intrínseca, sino que también perdían la respuesta al tratamiento con BCG. Por su parte, los ratones deficientes para IL-10 tenían una respuesta anti-tumoral intrínseca muy parecida a la de los ratones *wild-type* y, tras el tratamiento con BCG, su tasa de supervivencia era incluso mayor que la de los ratones silvestres (Riemensberger et al. 2002).

En conjunto, estos datos ponen de manifiesto que las células NK están desempeñando un papel muy importante en la respuesta inmunitaria asociada a la inmunoterapia con BCG para el cáncer de vejiga.

#### 4. LAS CÉLULAS NATURAL KILLER

Las células asesinas naturales o *Natural Killer* (NK) son la tercera población de linfocitos más importante en sangre periférica, después de los linfocitos T y los linfocitos B, donde representan entre un 5% y un 20% de los linfocitos. Estas células son linfocitos citotóxicos caracterizados por contener en su interior un alto contenido de gránulos líticos preformados. A diferencia de lo que ocurre con las células T (CD3<sup>+</sup>), las células NK pueden responder frente a una célula diana sin necesidad de reconocimiento específico de antígeno, aunque sí son capaces de reconocer a las moléculas MHC propias. Esto hace que se clasifiquen dentro de la inmunidad innata (Caligiuri 2008; Long et al. 2013; Mandal and Viswanathan 2015).



La importancia de las células NK no sólo reside en su capacidad citotóxica, sino también en su capacidad para modular la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa, bien por la interacción directa con otras células del sistema inmunitario, como pueden ser las células dendríticas, o a través de su función secretora de citoquinas (revisado en (Long et al. 2013)). De hecho, las células NK son las principales productoras de IFN- $\gamma$  *in vivo*, siendo ésta una de las citoquinas más importantes en la inducción de la respuesta Th1 (Martín-Fontecha et al. 2004; Waldhauer and Steinle 2008).

Como ya se adelantó en apartados anteriores, en humanos estas células se caracterizan fenotípicamente por la expresión de la molécula de adhesión CD56 (NCAM1, del inglés “*Neural Cell Adhesion Molecule 1*”), y la ausencia de CD3, el receptor de las células T (Caligiuri 2008). A pesar de que la expresión de CD56 parece no aportar ninguna ventaja a la capacidad citotóxica de las células NK (Lanier et al. 1991), el nivel de expresión de esta molécula permite distinguir dos subpoblaciones de células NK diferentes: las células NK CD56<sup>brillante</sup> o CD56<sup>bright</sup> que no expresan el receptor de baja afinidad de la inmunoglobulina G (IgG), CD16, y las células NK CD56<sup>tenue</sup> o CD56<sup>dim</sup> que expresan niveles relativamente altos de CD16 (Lanier et al. 1986). Las células NK circulantes están enriquecidas en células NK CD56<sup>dim</sup>, que representan entre un 95% y un 98% del total de células NK. Sin embargo, en los tejidos linfoides secundarios, como amígdalas o nódulos linfáticos, la población de células NK más abundante es la CD56<sup>bright</sup> (Fehniger et al. 2003; Poli et al. 2009).

44 |

Además de las diferencias fenotípicas, estas dos poblaciones también son distintas a nivel funcional. Las células NK CD56<sup>dim</sup> son las que se consideran propiamente citotóxicas. Por su parte, las células NK CD56<sup>bright</sup> suelen tener una menor capacidad citotóxica mientras que pueden producir grandes cantidades de citoquinas y, por tanto, se suele hablar de ellas como células NK reguladoras o secretoras (Caligiuri 2008; Poli et al. 2009; Long et al. 2013).

A pesar de que la citotoxicidad de las células NK también puede estar mediada por la unión de ligandos de muerte, como la secreción de TNF- $\alpha$ , la unión de Fas Ligando (FasL) a Fas o la unión de TRAIL a su receptor, el mecanismo más común por el que estas células inducen la muerte de la célula diana es mediante la liberación de las granzimas y las perforinas que contienen en sus gránulos líticos (Zamai et al. 1998; Waterhouse and Trapani 2002). Así, las células NK CD56<sup>dim</sup>, además de tener una mayor facilidad para formar conjugados con sus células diana, cuentan con una carga mayor de gránulos líticos en su interior, en comparación con las células NK CD56<sup>bright</sup> (Jacobs et al. 2001). Por su parte, las células NK CD56<sup>bright</sup> están especializadas en la producción de IFN $\gamma$ , siendo las principales productoras de esta citoquina *in vivo*, así como de TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-10 e IL-13, entre otras (Fehniger et al. 1999; Jacobs et al. 2001).

Ciertas evidencias apuntan a que las células NK CD56<sup>dim</sup> provienen de las células NK CD56<sup>bright</sup>, como por ejemplo la mayor longitud de los telómeros de las células NK CD56<sup>bright</sup> o la expresión de CD57 como marcador de senescencia en la subpoblación CD56<sup>dim</sup> (Yu et al.



2013). Sin embargo, todavía hay cierta controversia en torno a este tema ya que se ha visto que en determinadas condiciones, *in vitro*, las células NK CD56<sup>dim</sup> también pueden aumentar la expresión de CD56 (Perussia et al. 2005; Freud et al. 2014; Michel et al. 2016).

Por último, el hecho de que las células NK de ratón no expresen la molécula CD56, identificándose normalmente como células NKp46<sup>+</sup> (Walzer et al. 2007), limita el estudio de la biología de estas dos subpoblaciones a los ensayos *in vitro* con células humanas ya que, en el modelo murino, no es posible distinguir dos subpoblaciones de células NK homólogas mediante la utilización de un único marcador (Hayakawa et al. 2006).

#### 4.1. RECEPTORES DE LAS CÉLULAS NK

Las células NK son capaces de reconocer tanto moléculas propias como moléculas derivadas de patógenos en las células diana. Para ello, a diferencia de lo que ocurre con el TCR de las células T citotóxicas, las células NK no precisan del reordenamiento genético de sus receptores, sino que cuentan con un amplio panel de receptores activadores e inhibidores capaces de reconocer varias familias de moléculas, permitiendo así un mayor control de la activación y respuesta de estas células. De esta forma, la célula NK sólo responderá frente a una célula diana si, tras la integración de todas las señales que reciben a través de sus receptores, se alcanza un determinado nivel umbral de activación (revisado en (Long et al. 2013)).

| 45

##### 4.1.1. Receptores activadores de las células NK

El receptor activador mejor caracterizado y que produce una activación más potente de las células NK es el receptor NKG2D (del inglés “*Natural Killer Group 2 D*”), también conocido como CD314. En humanos, su expresión no está restringida a la población de células NK, sino que también lo expresan todas las células T CD8<sup>+</sup>, las células T $\gamma\delta$ , algunos linfocitos T CD4<sup>+</sup> y las células NKT (Bauer et al. 1999; Huergo-Zapico et al. 2014). Los ligandos de este receptor pertenecen a dos familias de moléculas: MIC (del inglés “*MHC class-I-related Chain*”) –MICA y MICB– y ULBP (del inglés “*UL-16 Binding Protein*”) –ULBP1-5 y variantes de splicing–. La expresión de estas moléculas no es común en las células sanas, salvo excepciones como en el caso de MICA en células epiteliales del intestino (Groh et al. 1996) y de ULBP1 y ULBP2 en algunos monocitos activados (Vankayalapati et al. 2005). Sin embargo, en condiciones de estrés celular, como puede ser a causa de una infección viral, una transformación tumoral o daño genotóxico, las células aumentan el nivel de expresión de estas moléculas favoreciendo su reconocimiento por las células NK (Mistry and O’Callaghan 2007; Fernández-Messina et al. 2012).

Otros receptores activadores importantes en las células NK son los receptores de

citotoxicidad natural o NCRs (del inglés “*Natural Cytotoxicity Receptors*”): NCR1 o NKp46, NCR2 o NKp44 y NCR3 o NKp30 (Moretta et al. 2000). En este caso, su expresión sí está restringida a las células NK, aunque no todas las células NK los expresan. Además, las dos subpoblaciones de células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> expresan niveles diferentes de estos receptores. Por su parte, los ligandos de estos receptores son aún bastante desconocidos. A pesar de que se sabe que NKp46 y NKp44 pueden unirse a hemaglutininas virales (Mandelboim et al. 2001; Arnon et al. 2001) y NKp30 puede unirse a B7-H6 (Brandt et al. 2009), se desconoce si otras moléculas podrían activar a las células NK a través de estos receptores.

Otro receptor que activa a las células NK de manera muy potente en un contexto de infección, en presencia de anticuerpos, es el receptor de baja afinidad para la fracción cristalizante (Fc) de la IgG, FcγRIII o CD16. Este receptor está involucrado en la activación de las células NK a través del mecanismo denominado citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos o ADCC (del inglés “*Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*”). La expresión de CD16 está restringida, dentro de las células NK, a la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup>, aunque otras células hematopoyéticas también lo expresan (Caligiuri 2008).

Muchos otros receptores también pueden contribuir a la activación de las células NK, como DNAM-1 (CD226), que se une al receptor del poliovirus (PVR, CD155) y a Nectina-2 (CD112); 2B4 (CD244), que se une a CD48; CD2, que se une a LFA-3 (CD58); NKp80 y NKp65, que se unen a AICL (del inglés “*Activation-Induced C-type Lectin*”) y KACL (del inglés “*Keratinocyte-Associated C-type Lectin*”) respectivamente; o algunos TLRs (del inglés “*Toll-Like Receptors*”), como TLR3 y TLR9 (Sivori et al. 2000; Bottino et al. 2003; McNerney and Kumar 2006; Sivori et al. 2006; Welte et al. 2006; Spreu et al. 2010).

Los diferentes receptores activadores contribuyen de manera diferente a la activación de las células NK. Salvo en el caso de CD16, que está involucrado en la respuesta mediada por anticuerpos y no en la citotoxicidad natural, la respuesta mediada por el resto de receptores necesita del apoyo de otros, así como de moléculas de adhesión, para activar a la célula NK. De esta forma, la estimulación de varios receptores combinados produce, de manera sinérgica, una mayor activación en la célula NK, pero también permite que ésta se pueda controlar mejor (Bryceson et al. 2006; Long et al. 2013).

#### 4.1.2. Receptores inhibidores de las células NK

Los receptores inhibidores más importantes en el control de la activación en las células NK pertenecen a la familia de los KIR (del inglés “*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*”). Estos receptores tipo inmunoglobulina son capaces de reconocer específicamente las moléculas MHC-I, en humano HLA-I, expresadas por las células normales del organismo, impidiendo así la activación de las células NK frente a células propias (Colonna and Samaridis 1995;

Wagtmann et al. 1995). La expresión de los receptores KIR también es diferente en las dos subpoblaciones de células NK, encontrándose restringida a la subpoblación CD56<sup>dim</sup>. A pesar de que los receptores KIR inhibidores han sido los más estudiados, también existen receptores KIR activadores, aunque sus ligandos todavía no se conocen bien. En muchas ocasiones, los KIR inhibidores y los KIR activadores comparten la parte extracelular, de tal forma que las diferencias asociadas a su función se encuentran, principalmente, en la parte intracelular, donde los primeros cuentan con una cola citoplasmática larga que contiene motivos inhibidores ITIM (del inglés "*Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif*") y los segundos cuentan con una cola citoplasmática más corta que se acopla con moléculas activadoras, como DAP12 (Moretta 1995; McVicar et al. 1998).

Otro receptor inhibidor importante en el control de la respuesta por parte de las células NK es el constituido por el heterodímero CD94/NKG2A, que reconoce moléculas MHC no clásicas, en humano HLA-E (Carretero et al. 1997). La expresión de la molécula CD94 también es diferente en las dos subpoblaciones de células NK, siendo más alta en la subpoblación CD56<sup>bright</sup> que en la subpoblación CD56<sup>dim</sup>. En general, la molécula CD94 suele estar asociada a NKG2A, aunque también puede formar heterodímeros con NKG2C, dando lugar a un receptor activador. Se ha descrito que pacientes infectados con citomegalovirus humano o HCMV (del inglés "*Human CytoMegalovirus*") y también pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana o HIV (del inglés "*Human Immunodeficiency Virus*") tienen una población de células NK NKG2C<sup>+</sup> expandida, que, junto con la expresión de CD57, se ha propuesto como una población con memoria inmunológica (Gumá et al. 2006; Lima et al. 2014; Della Chiesa et al. 2015).

Muchos otros receptores, como los LIRL, que reconocen otras moléculas MHC, KLRG-1, que reconoce cadherinas, o PD-1, que reconoce PD-1 Ligando (PD-1L), también pueden contribuir a la inhibición de la respuesta en las células NK (Navarro et al. 1999; Lepin et al. 2000; Ito et al. 2006; Benson et al. 2010).

#### 4.1.3. Moléculas de adhesión de las células NK

Cabe destacar que, para que se produzca el reconocimiento y la respuesta de la células NK frente a la célula diana, es muy importante que la célula NK se pueda unir, a través de las moléculas de adhesión, a la célula diana. Para ello, las células NK cuentan con integrinas tales como LFA-1, LFA-3, Mac-1, VLA-4 y VLA-5, así como con otras moléculas de adhesión como L-selectina (cuya expresión está restringida a la subpoblación CD56<sup>bright</sup>). Además, los receptores activadores DNAM-1, 2B4 y CD2 también pueden actuar como moléculas de adhesión favoreciendo la unión de la célula NK con su célula diana (Helander and Timonen 1998; Sivori et al. 2000; Bottino et al. 2003; McNerney and Kumar 2006; Long et al. 2013).

#### 4.1.4. Receptores de citoquinas y quimioquinas de las células NK

Si bien las células NK pueden modular la respuesta de otras células a través de la secreción de factores solubles, diversos factores solubles son capaces, a su vez, de modular la respuesta de estas células citotóxicas. Para ello, cuentan con una gran variedad de receptores para citoquinas y para quimioquinas. Sin embargo, su expresión, así como el nivel al que se expresan, no es igual en las dos subpoblaciones de células NK (Cooper et al. 2001).

Entre los receptores de citoquinas destacan los receptores de IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, entre otros, que provocan la proliferación y activación de las células NK (Zwirner and Domaica 2010).

Por su parte, la expresión de distintos de receptores de quimioquinas va a determinar la localización de las dos subpoblaciones de células NK en el organismo. Si bien ambas poblaciones de células NK expresan los receptores CXCR3 y CXCR4, aunque no al mismo nivel, las dos pueden ser reclutadas a sitios donde haya inflamación y se produzca CXCL10 o IP-10, y/o CXCL12 o SDF1. Otros receptores se encuentran restringidos a una sola subpoblación, como es el caso del receptor CCR7, que sólo se expresa en la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup>, lo que favorece la migración de estas células a los nódulos linfáticos. Por su parte, el hecho de que la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> no lo exprese va a favorecer que estas células sigan en circulación (Inngjerdigen 2001; Berahovich et al. 2006; Förster et al. 2008; Maghazachi 2010).

#### 4.2. ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA CITOTÓXICA EN LAS CÉLULAS NK

Como se ha mencionado anteriormente, la capacidad citotóxica de las células NK se basa, principalmente, en la liberación de gránulos líticos tras el reconocimiento de una célula diana adecuada. La activación y liberación de los gránulos líticos por parte de las células NK está determinada por el desequilibrio en las señales inhibitoras y activadoras que la célula NK recibe y transduce al núcleo a través del amplio panel de receptores que expresa en su superficie (*figura 3*) (Long et al. 2013).

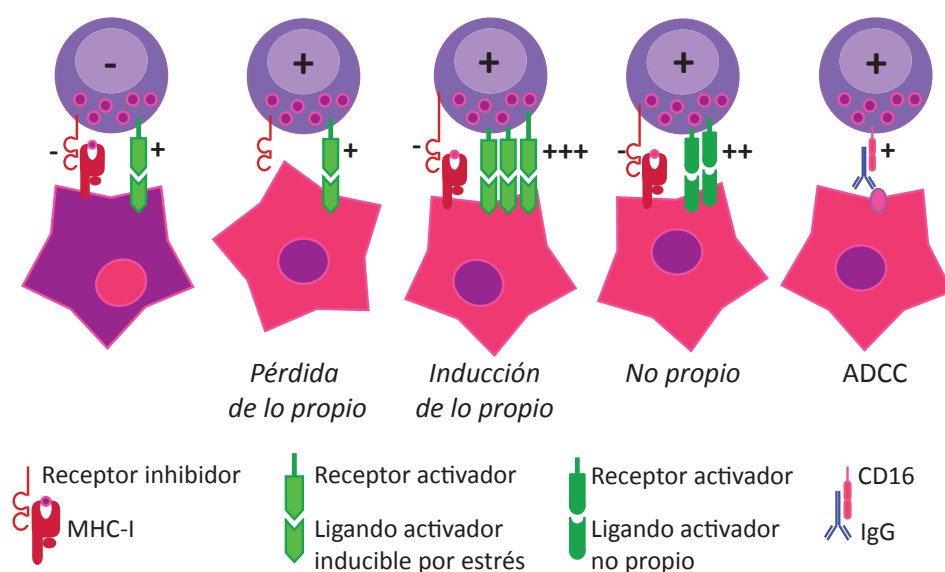
Así, en 1990, se propuso la hipótesis de “pérdida de lo propio” o “*missing-self*” para explicar el mecanismo por el cual se regulaba la activación de las células NK. Según esta hipótesis, la interacción de los receptores inhibidores de las células NK con las moléculas MHC-I, expresadas de forma ubicua en células sanas, impediría que las células NK se activaran y las eliminaran. Sin embargo, cuando las células disminuyen la expresión de estas moléculas MHC-I, fenómeno muy común en infecciones virales y transformaciones tumorales, la interacción entre la célula diana y la célula NK a través de estos receptores no se producirá, de tal forma que la célula recibirá menos señales inhibitoras y se activará para eliminar a esa célula diana (Ljunggren and Kärre 1985; Kärre et al. 1986; Ljunggren and Kärre 1990). Esta hipótesis se comprobó en

experimentos *in vivo* pero no explicaba por qué, en determinadas ocasiones, las células NK no respondían frente algunas células que habían perdido la expresión de estas moléculas MHC-I mientras que sí respondían frente a otras células que sí expresaban MHC-I.

Con el descubrimiento del receptor activador NKG2D de las células NK, se propuso el modelo de “inducción de lo propio” o “*induced-self*”. Según este modelo, las células del propio organismo, debido a alguna alteración como puede ser estrés metabólico o infección, son capaces de inducir la expresión de nuevos ligandos activadores, por ejemplo de ligandos para el receptor NKG2D, que las convierte en células diana (Bauer et al. 1999; Diefenbach and Raulet 2001). De esta forma, tras su reconocimiento, los receptores activadores de las células NK desencadenan la activación y posterior respuesta citotóxica. Además, completando el amplio espectro de respuesta de las células NK, éstas no sólo reconocen el aumento en la expresión de moléculas propias, como puede ser el caso de los ligandos de NKG2D, sino que también son capaces de reconocer algunas moléculas “no propias”, como pueden ser las hemaglutininas virales, por medio de otros receptores como NKp46 o NKp44 (Mandelboim et al. 2001; Arnon et al. 2001).

Finalmente, al margen de la citotoxicidad natural presentada por las células NK, éstas también pueden activarse y responder por el mecanismo de ADCC. Esta respuesta citotóxica de las células NK requiere la presencia de anticuerpos, bien producidos por células plasmáticas, en el contexto de una respuesta inmunitaria adaptativa, o bien administrados de manera exógena, como puede ser en el caso de ciertos tipos de inmunoterapia con anticuerpos. De esta forma, a través de CD16, la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> es capaz de reconocer IgG unidas a sus antígenos en las células diana y responder frente a ellas (Ojo and Wigzell 1978).

| 49



**Figura 3.** Modelos de activación de la respuesta citotóxica, mediada por la liberación del contenido de sus gránulos líticos, en las células NK.

# OBJETIVOS

Las células NK han demostrado ser esenciales en la respuesta al tratamiento con BCG para el cáncer de vejiga superficial en modelos murinos. Además, se ha descrito que, *in vitro*, son capaces de eliminar células tumorales uroteliales. Sin embargo, la caracterización de la interacción entre las células NK y las células tumorales uroteliales, así como el efecto que la micobacteria ejerce sobre esa interacción, no se había estudiado en profundidad.

Para estudiar en detalle la función de las células NK en respuesta al tratamiento con BCG utilizado en el cáncer de vejiga superficial, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Establecer un sistema modelo *in vitro* que permita el estudio de la interacción entre las células NK y las células tumorales uroteliales en el contexto de BCG.
  - 1.1. Analizar las moléculas, tanto ligandos como receptores, implicadas en la interacción entre las células tumorales uroteliales y las células NK, así como la respuesta de estas células citotóxicas tras esa interacción.
  - 1.2. Estudiar el efecto de la micobacteria en las células tumorales uroteliales. Analizar los cambios producidos en cuanto al reconocimiento y la respuesta de estas células por parte de las células NK.
  - 1.3. Estudiar el efecto de la micobacteria en las células NK, tanto recién purificadas como de líneas primarias mantenidas en IL-2 o en el contexto del total de células de sangre periférica. Analizar los cambios producidos en cuanto al reconocimiento y la respuesta de estas células citotóxicas frente a las células tumorales uroteliales.
2. Analizar la intensidad de la respuesta inmunitaria en muestras de sangre y orina de un grupo de pacientes tratados con BCG, mediante el estudio de poblaciones celulares y factores solubles.
  - 2.1. Analizar marcadores de poblaciones y de diferenciación y/o activación celular en PBMCs.
  - 2.2. Analizar el contenido de citoquinas y quimioquinas en sobrenadantes de orina.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. REACTIVOS

#### 1.1. Anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales utilizados para citometría de flujo han sido:

Molécula que reconoce	Clon	Procedencia
CD3	T3d	Prof J.L. Strominger (Harvard University)
CD48	MEM-102	Diaclone
CD56	#301040	R&D
CD106/VCAM-1	51-10C9	Pharmingen
CD112/Nectina2	B-C12	Santa Cruz Biotechnology
CD155/PVR	D171	Abcam
E-cadherina	67A4	Immunotech
HLA-C	L31	Prof J.L. Strominger (Harvard University) (Giacomini et al. 1997)
KLRG-1	13F12F2	Dr. H. Pircher (University Medical Center Freiburg) (Marcolino et al. 2004)
MHC-I	HP-IF7	Dr. Miguel López-Botet (Universidad Pompeu Fabra) (Pérez-Villar et al. 1997)
MICA	1H10	(Valés-Gómez et al. 2006; Ashiru et al. 2013)
NKG2D	149810	R&D
ULBP1	170818	R&D
ULBP2	165903	R&D
ULBP3	166510	R&D
Isotipo (IgG1 ratón)	MOPC-21	Sigma

Los anticuerpos secundarios utilizados para citometría de flujo han sido:

Molécula que reconoce	Fluorocromo	Procedencia
IgG1 de ratón	FITC	DakoCytomation
IgG1 de ratón	PE	DakoCytomation

Los anticuerpos conjugados utilizados para citometría de flujo han sido:

Molécula que reconoce	Fluorocromo	Clon	Procedencia
CD3	CF	UCHT-1	Immunostep
CD3	FITC	OKT3	Biolegend
CD4	PerCP/Cy5.5	OKT4	Biolegend

Molécula que reconoce	Fluorocromo	Clon	Procedencia
CD8	PE/Cy7	SK1	Biolegend
CD16	PE/Cy7	3G8	Biolegend
CD25	PB	BC96	Biolegend
CD54/ICAM-1	FITC	84H10	Immunotech
CD56	APC	CMSSB	eBioscience
CD56	FITC	MEM-188	Biolegend
CD56	PE	HCD56	Biolegend
CD56	PE/Cy5	NKH-1	Immunotech
CD57	FITC	HNK-1	BD FACS™
CD58/LFA3	FITC	AICD58	Immunotech
CD69	APC/Cy7	FN50	Biolegend
CD69	PE/Cy7	FN50	Biolegend
CD107a/LAMP1	APC	H4A3	Biolegend
CD158a	PE	EB6	Beckman Coulter
CD158b	PE	GL183	Beckman Coulter
CXCR3	APC	G025H7	Biolegend
Granzima B	APC/Cy7	GB11	Mabtech
IFN $\gamma$	PE	4S.B3	Biolegend
NKG2D	APC	1D11	Biolegend
NKp30	APC	P30-15	Biolegend
NKp46	PB	9E2	Biolegend
Perforina	APC/Cy7	dG9	Biolegend
IgG1 de ratón	FITC		DakoCytomation
IgG1 de ratón	PE		DakoCytomation

58 |

Los anticuerpos monoclonales utilizados en los experimentos de bloqueo han sido:

Molécula que reconoce	Clon	Bloqueo en	Procedencia
CD20 (Rituximab)		Células Raji	Farmacia Hospital La Paz (Madrid)
MHC-I	HP-IF7	Células tumoraes uroteliales	Dr. Miguel López-Botet (Universidad Pompeu Fabra) (Pérez-Villar et al. 1997)
DNAM-1	102511	Células NK	R&D
NKG2D	149810	Células NK (y T)	R&D
NKp30	210845	Células NK	R&D
NKp46	195314	Células NK	R&D
IL-12p70	20C2	IL-12 en sobrenadantes	Dr. Miguel López-Botet (Universidad Pompeu Fabra) (Chizzonite et al. 1991)

### 1.2. Proteínas de fusión NKp46 y NKp30 - Fc

Para reconocer los ligandos de los NCR, se utilizaron proteínas de fusión con los receptores NKp46 y NKp30 en tinciones de citometría de flujo. Las proteínas de fusión de NKp46 y NKp30 se prepararon cambiando la porción Fc humana, de las construcciones que ya habían sido descritas previamente (Mandelboim et al. 2001; Chisholm and Reyburn 2006), por la porción Fc murina de la inmunoglobulina IgG1, para minimizar las interacciones Fc/Fc en la citometría de flujo con células humanas (García-Cuesta et al. 2015).

Se produjeron transfectantes estables con células HEK293FT (Life Technologies), que se mantuvieron en cultivo en medio DMEM con 4,5 mg/l de glucosa (Lonza), suplementado con 10% suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, 1 µg/ml de puromicina, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 U/ml (Biowest).

### 1.3. Otros reactivos

Otros reactivos de uso habitual en el laboratorio, si no se indica lo contrario, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich.

## 2. LÍNEAS CELULARES

Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, y 95% de humedad.

Las líneas de células tumorales de vejiga utilizadas fueron: T24 (Bubeník et al. 1973), UM-UC-3 (Grossman et al. 1986), J82 (O'Toole et al. 1978), RT-112 (Masters et al. 1986), RT4 (Masters et al. 1986) y SW780 (Kyriazis et al. 1984), disponibles en la ATCC, fueron donadas por el Dr. Francisco Real (CNIO, Madrid). El servicio de genómica del IIB (CSIC) las genotipó confirmando que, efectivamente, se trataba de células de cáncer de vejiga utilizando StemElite ID System (Promega). Estas células se mantuvieron en medio de cultivo EMEM (Lonza), suplementado con 10% FBS, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 U/ml.

Las líneas celulares Daudi (linfoma de células B) y RPMI-8866 (linfoma de células B) se utilizaron para el mantenimiento de las líneas primarias de células NK. Por otra parte, las líneas celulares K562 (eritroleucemia), 721.221 (línea de células B transformada con el virus de Epstein-Barr [EBV] y sometida a mutagénesis para eliminar HLA-I) y Raji (linfoma de Burkitt positivo para EBV) se utilizaron en experimentos de co-cultivo con estas células. En todos los casos, las líneas celulares se mantuvieron en cultivo en medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado con 10% FBS, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 U/ml (Biowest).

### 3. PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCs)

---

A partir de preparados linfocitarios (del inglés “*buffy coats*”) de voluntarios sanos, obtenidos del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid, se purificaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs a partir de ahora). La purificación se hizo mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Para ello, se diluyó la sangre 1:2 en PBS y se puso sobre el Ficoll-Paque para luego centrifugar a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1800 rpm y sin freno. Las PBMCs se recogieron de la interfase entre el Ficoll y el sobrenadante, y se lavaron en PBS hasta 4 veces para eliminar las plaquetas.

En algunos experimentos, se utilizaron todos las PBMCs. Éstas se mantuvieron en cultivo en placa de 24 pocillos, a  $10^6$  células/ml, en medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado con 5% HS (suero humano de varones AB<sup>-</sup>), 5% FBS, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml (Biowest),  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck) 50  $\mu$ M y hepes (Lonza) 10 mM.

En otros experimentos, fue necesario purificar células NK como se explica a continuación.

### 4. PURIFICACIÓN DE CÉLULAS NK Y ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS PRIMARIAS

---

60 |

Para la purificación de las células NK, se obtuvieron PBMCs como se indica en el apartado anterior y, una vez lavadas, se aislaron las células NK por selección negativa siguiendo las instrucciones del fabricante de los diferentes kits utilizados: de Miltenyi (*MACS NK isolation kit*) o de STEMCELL (*Human NK cell enrichment kit*). En los experimentos indicados, se utilizaron las células NK recién purificadas. Para el resto de experimentos se establecieron líneas primarias de células NK.

Para el establecimiento de líneas primarias de células NK a partir de donantes sanos, tras la purificación, se incubaron las células con células Daudi y RPMI-8866 irradiadas a 40 Gy en medio RPMI 1640 (Biowest) suplementado con 10% HS, 10% FBS (durante la primera semana, después 5% HS, 5% FBS), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml (Biowest),  $\beta$ -mercaptoetanol (Merck) 50  $\mu$ M, hepes (Lonza) 10 mM y rhIL-2 (Peprotech) 50 IU/ml.

Se comprobó semanalmente que la pureza de las células NK fuera superior al 90%, por citometría de flujo, y la línea se mantuvo en cultivo durante, como máximo, un mes y medio.

### 5. SEPARACIÓN CELULAR UTILIZANDO UN CITÓMETRO DE FLUJO SEPARADOR

---

Con el apoyo del servicio de citometría de flujo del Centro Nacional de Biotecnología (CNB),

se purificaron células NK CD56<sup>bright</sup> y células NK CD56<sup>dim</sup>, así como PBMCs a los que le faltaba una de las dos subpoblaciones de células NK, utilizando el citómetro de flujo separador de alta velocidad HIPERSORT MoFlow XDP.

Para ello, se purificaron PBMCs como se indica en el apartado 3 y, una vez lavadas, se marcaron con los anticuerpos anti-CD3-FITC y anti-CD56-PE durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se procesaron a través del citómetro de flujo separador según las instrucciones del fabricante.

## 6. BCG

---

En la mayoría de experimentos se utilizó la cepa Tice<sup>TM</sup> de BCG (OncoTICE, Merck Canada Inc.). Para algunos experimentos se utilizaron la cepa Connaught (Sanofi Pasteur Limited) y la cepa Danesa (Danish 1331, Pfizer).

Tras reconstituir el liofilizado de BCG, se prepararon alícuotas en RPMI con DMSO y se almacenaron a -20°C, sin que la viabilidad de la micobacteria se viese afectada en este proceso.

Para comprobar la viabilidad de la micobacteria, varios viales fueron titulados mediante diluciones seriadas 1:10 que se sembraron por extensión en placas con Agar BBL<sup>TM</sup> Middlebrook 7H11 (BD), suplementado con 10% Middlebrook OADC Growth supplement (BD) y 0,5% glicerol. Estas placas se incubaron a 37°C y humedad durante 15-20 días.

| 61

## 7. CO-INCUBACIONES CON BCG

---

### 7.1. BCG y Células tumorales de vejiga

---

Para ver el efecto que la BCG tenía sobre las células tumorales uroteliales, bien para ver cambios en moléculas de superficie o para ver cambios en la respuesta de las células NK tras su exposición a estas células, tratadas o sin tratar con BCG, se plaquearon  $5 \times 10^5$  células tumorales uroteliales por pocillo en placas de 6 pocillos y, una vez adheridas, se añadió BCG a la ratio y durante el tiempo indicados en cada experimento.

### 7.2. BCG y Células NK

---

Para ver el efecto que la BCG tenía directamente sobre las células NK, tanto procedentes de líneas de células NK primarias como células recién purificadas, se incubaron, en placas de 24 pocillos a una concentración de  $10^6$  células/ml, en presencia o ausencia de BCG, a una ratio 1:1, durante el tiempo indicado en cada experimento. Tras ese tiempo, se recogieron las células, se centrifugaron y se utilizaron en ensayos de desgranulación.

### 7.3. BCG y PBMCs

---

Para ver el efecto que la BCG tenía sobre las células NK, en el contexto del total de células mononucleares de sangre periférica, las PBMCs se incubaron en placas de 24 pocillos a una concentración de  $10^6$  células/ml, en presencia o ausencia BCG a la ratio indicada en cada experimento. En los días indicados para cada experimento, se recogieron las células en suspensión, se centrifugaron y se utilizaron para los ensayos correspondientes.

También se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron a  $200 \times g$  para eliminar las células y se almacenaron congelados para utilizarlos en ensayos de medio condicionado (diluidos en medio fresco 1:2) o para analizar la presencia de citoquinas por Luminex.

## 8. ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

---

Para determinar la presencia y los niveles de expresión de ciertas moléculas en la superficie de las células, se utilizó la citometría de flujo.

Para ello, se lavaron las células con PBA: PBS con 0,5%, albúmina bovina (BSA), 1% FBS y 0,1% azida sódica.

Para la tinción, se incubaron las células con anticuerpos conjugados directamente con un fluorocromo o con anticuerpos primarios monoclonales específicos para la molécula de interés, seguido de la incubación con el anticuerpo secundario marcado con FITC o PE, a la concentración que recomienda cada casa comercial, durante 30-40 min y siempre a  $4^{\circ}\text{C}$ . En las incubaciones con anticuerpos conjugados o con los anticuerpos secundarios marcados con FITC o PE, las células además estuvieron en oscuridad.

Para la tinción intracelular, se fijaron las células previamente con p-formaldehído (PFA) 2% durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Tras dos lavados con PBA, se resuspendieron en PBA con saponina 0,2% y se incubaron con el anticuerpo específico para la molécula de interés. Una vez terminada la tinción, se realizaron dos lavados con PBA con saponina 0,2% y un último lavado con PBA.

Las muestras se analizaron utilizando los citómetros de flujo: BD FACSCalibur (Becton Dickinson), Gallios Flow Cytometer o Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). El análisis de los resultados obtenidos por citometría de flujo se analizó con los *softwares* Summit, Kaluza y FlowJo.

## 9. ENSAYOS DE DESGRANULACIÓN

---

Para los ensayos de desgranulación se utilizaron, como células efectoras, células NK recién

purificadas o de líneas primarias establecidas y PBMCs totales, sin estimular o estimuladas con BCG. La desgranulación se mide como el porcentaje de células que presentan LAMP-1 en su superficie tras haber sido expuestas a una determinada célula diana. La molécula LAMP-1 se encuentra en la cara interna de la membrana de los gránulos líticos por lo que, una vez que la célula haya desgranulado, se queda expuesta sobre la superficie de la célula NK, pudiendo detectarse por citometría de flujo.

La ratio célula efectora : célula diana utilizada está indicada en cada experimento. Cuando se utilizan células NK, la ratio suele ser 1:2. Cuando se utilizan PBMCs totales, la ratio pasa a ser 5:1, ya que se asume que las células NK son un 10% del cultivo y de esta forma, de nuevo, la ratio célula NK : célula diana vuelve a ser 1:2.

Este ensayo consiste en la co-incubación de las células efectoras con las células diana durante 2h, aunque en algunos casos se ha hecho a 6h. En ese caso, ha sido necesario incluir en el medio, una vez transcurrida la primera hora de co-incubación, monensina (Sigma) a una concentración final de 2,5  $\mu$ M, para bloquear el tráfico vesicular e impedir así la internalización de la molécula LAMP-1.

Transcurrido ese tiempo, se recogieron las células y se marcaron para, posteriormente, analizar por citometría de flujo el porcentaje de células NK que eran LAMP1<sup>+</sup>, es decir, que había desgranulado.

Como control negativo de este ensayo, se incubaron las células NK en ausencia de células diana. Como control positivo, se utilizó la línea celular K562 como célula diana, ya que es una diana clásica de las células NK caracterizada por carecer de moléculas MHC y expresar ULBP1 y ULBP2.

| 63

## 10. BLOQUEO DE RECEPTORES O MHC-I

---

Para los ensayos de desgranulación, de producción de IFN $\gamma$  o ensayos de citotoxicidad en los que se bloqueaban diferentes receptores en las células NK, antes de iniciar la co-incubación con las células diana, las células efectoras se incubaban en presencia del anticuerpo de bloqueo necesario en cada caso, a una concentración de 5  $\mu$ g/ml durante 20 min a temperatura ambiente.

En los experimentos en los que se bloqueaban las moléculas MHC de clase I en las células diana, antes de co-incubarlas con las células efectoras, las células diana se incubaban en presencia del anticuerpo anti-MHC de clase I (HP-IF7) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 30 min a temperatura ambiente.

## 11. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPO (ADCC)

Para los ensayos de ADCC, se utilizaron como células efectoras PBMCs totales sin estimular o estimuladas con BCG, y como células diana la línea celular Raji, que fue donada por el Prof J.L. Strominger (*Department of Stem Cell and Regenerative Biology, Harvard University*).

Las células Raji se incubaron en presencia de Rituximab (RTX) a una concentración de 10 µg/ml durante 30 min a temperatura ambiente, antes de ser utilizadas como dianas en ensayos de desgranulación. RTX es un anticuerpo humanizado IgG1, específico para el antígeno CD20 que se expresa solamente en células B maduras (Reff et al. 1994; Manches et al. 2003). Ya que las células Raji expresan moléculas MHC-I y no tienen moléculas activadoras en su superficie que estimulen la respuesta por parte de las células NK, éstas sólo se activarán en respuesta a aquellas células Raji que tienen RTX unido. Esta activación estará mediada por el receptor CD16 de las células NK que reconoce la porción Fc del anticuerpo.

Estos ensayos se realizaron igual que los ensayos de desgranulación, co-incubando las PBMCs con las células Raji durante 2 horas a una ratio 5:1 (efectora : diana).

Como controles negativos, se incubaron las células NK en ausencia de célula diana y con células Raji que no tenían RTX unido.

64 |

## 12. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Para los ensayos de citotoxicidad, se marcaron las células tumorales con calceína AM (Molecular Probes). La calceína AM no es fluorescente hasta que es absorbida por las células que, por el efecto de esterasas, la transforman en calceína fluorescente.

En estos ensayos, las células tumorales de vejiga se pusieron a una concentración de  $1,5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 24 pocillos, y se incubaron en presencia de calceína AM a una concentración de 0,5 µg/ml en medio MEM con 10% FBS durante 16h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido ese tiempo, se les cambió el medio por medio fresco y se incubaron durante 2h para darles tiempo a liberar el exceso de calceína. A continuación, y en triplicados, se pusieron en cultivo con las células efectoras a las diferentes ratios indicados en cada experimento, y se incubaron durante 4h. Tras el tiempo de incubación, se recogieron los sobrenadantes, se centrifugaron para eliminar las células y el nuevo sobrenadante se analizó utilizando el Envision® Multilabel Reader (Perkin Elmer), con los siguientes parámetros de medida: excitación a 486 nm, emisión a 530 nm. La lisis específica se midió como porcentaje de lisis celular y se calculó como:

$$\% \text{ lisis celular} = \frac{\text{valor} - \text{espontánea}}{\text{máximo} - \text{espontánea}} \times 100$$



La liberación de calceína “espontánea” es el valor obtenido del sobrenadante de aquellas células que no fueron incubadas con las células efectoras. El “máximo” es el valor obtenido del sobrenadante de las células lisadas en presencia de 0,1% SDS (Dodecilsulfato sódico). En todos los experimentos, la liberación espontánea ha sido menor del 25% del máximo.

En paralelo a estos experimentos, se han realizado ensayos de desgranulación como control de la respuesta de las células NK frente a las células diana.

### 13. ENSAYOS DE PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$

Para los ensayos de producción de IFN $\gamma$  se utilizaron, como células efectoras, células NK recién purificadas o de líneas primarias establecidas y PBMCs totales, sin estimular o estimuladas con BCG.

La ratio célula efectora : célula diana está indicada en cada experimento. Cuando se utilizan células NK, la ratio suele ser 1:2. Cuando se utilizan PBMCs totales, la ratio pasa a ser 5:1, ya que se asume que las células NK son un 10% del cultivo y de esta forma, de nuevo, la ratio célula NK : célula diana vuelve a ser 1:2.

Este ensayo consiste en la co-incubación de las células efectoras con las células diana durante 6h. Después de la primera hora de incubación, se añade monensina a una concentración final de 2,5  $\mu$ M que, al bloquear el tráfico vesicular, provoca la acumulación de IFN $\gamma$  en el Aparato de Golgi.

Transcurrido ese tiempo, se recogieron las células, se marcaron extracelularmente para, después, fijar, permeabilizar, marcar IFN $\gamma$  y, finalmente, analizar por citometría de flujo el porcentaje de células NK que eran IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, es decir, que habían producido IFN $\gamma$  en respuesta a la diana a la que se enfrentara.

Como control positivo, se incubaron las células NK recién purificadas sin células diana pero con 100 ng/ml de PMA (Calbiochem), que es un análogo del diacilglicerol (DAG), e ionomicina 0,5  $\mu$ M (Sigma), que es un ionóforo que facilita el transporte de Ca<sup>2+</sup> al interior celular. De esta forma, se imita la estimulación de PLC $\gamma$ , independiente de receptor, y, a través de RasGRP, se activan las proteínas de señalización que regulan la producción de citoquinas (Lee et al. 2009).

### 14. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Para los ensayos de proliferación, se marcaron las células con el marcador de proliferación CellTrace Violet stain (Molecular Probes). Este compuesto difunde hacia el interior de las células donde, una vez procesado por esterasas, se convierte en un compuesto fluorescente que se une covalentemente a aminos intracelulares. Así, cada vez que la célula se divide, este

marcador de proliferación se repartirá entre las dos células hijas provocando un descenso en su fluorescencia que se podrá detectar por citometría de flujo.

En estos ensayos, una vez purificadas las PBMCs, se incubaron en CellTrace Violet stain (Molecular Probes) durante 20 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, según las instrucciones del fabricante. Tras ese tiempo, se añadió RPMI 10% FBS y se incubaron las células durante 5 minutos. Finalmente, se lavaron las células de nuevo en medio RPMI 10% FBS y se plaquearon en presencia o ausencia de BCG como se indica en el *punto 7.3* de “*Materiales y Métodos*”.

## 15. ANÁLISIS DE LA VIABILIDAD CELULAR

Para los ensayos de viabilidad celular, se marcaron las células con Anexina V y 7-amino actinomicina D (7-AAD). La Anexina V se une a la fosfatidilserina que, en los estadios tempranos de la apoptosis, se transloca de la cara interna de la membrana plasmática a la externa. Por su parte, el 7-AAD se une de manera muy eficiente al ADN, de tal forma que sólo lo incorporan las células que no tienen la membrana plasmática intacta. Así, es posible distinguir aquellas células que están vivas (Anexina V<sup>-</sup> 7-AAD<sup>-</sup>), de las que están en una fase apoptótica temprana (Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup>) o tardía (Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>).

66 |

Para ello, se incubaron las células con los anticuerpos conjugados anti-CD3-FITC y anti-CD56-APC durante 30 minutos a 4°C y en oscuridad. A continuación, se lavaron e incubaron durante 15 minutos a 4°C y en oscuridad con 5 µl de Anexina V-PE (Immunostep) y 20 µl de 7-AAD (Sigma) en 100 µl de la solución tampón de unión con Anexina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se analizaron por citometría de flujo.

## 16. ANÁLISIS LUMINEX

En colaboración con la Dra. Omodele Ashiru, del grupo de la Dra. Mei M. Ho (*National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK*), se analizó, por Luminex, el contenido de citoquinas y quimioquinas en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs y BCG y en las muestras de orina.

Todas las muestras analizadas se diluyeron 1:2 utilizando la solución tampón provista por el fabricante (Calibrator Diluent RD6-52, de R&D Systems) con 10 mM Tris-HCl pH 7,6. Cada muestra se analizó por duplicado utilizando los ensayos de cribado para muestras humanas con esferas magnéticas Luminex® (R&D Systems) y los instrumentos de análisis Luminex® 100™ or 200™ (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generaron curvas estándar de cinco parámetros y se interpolaron en ellas las concentraciones de cada analito en cada muestra (teniendo en cuenta el factor de dilución) utilizando el software Bio-Plex™ (Bio-Rad).

## 17. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El software utilizado para el análisis estadístico ha sido GraphPad Prism 6. Para cada experimento, se ha aplicado el test estadístico correspondiente, el cual se encuentra detallado en los pies de figura.

Cuando  $p < 0,05$ , las diferencias se consideraron estadísticamente significativas. El valor  $p$  se ha indicado como: n.s. no significativo, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Cuando no se ha especificado, se asume que  $p > 0,05$  y, por tanto, no hay diferencias significativas.

## PACIENTES

Las muestras de sangre y orina de pacientes con cáncer de vejiga superficial fueron facilitadas por el Dr. Luis Martínez-Piñeiro y el Dr. Mario Álvarez Maestro, de la Unidad de Urología del Hospital Infanta Sofía (San Sebastián de los Reyes, Madrid).

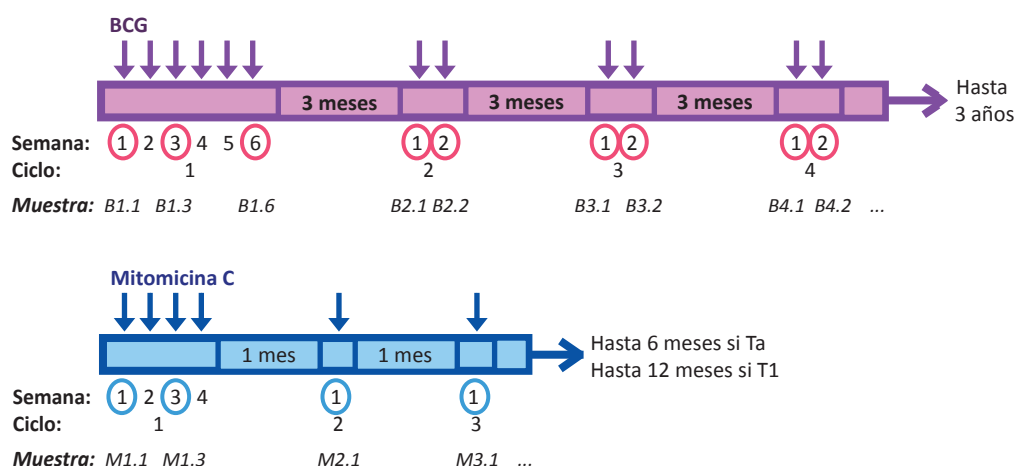
Los experimentos se llevaron a cabo con el entendimiento y el consentimiento informado escrito por parte de todos los participantes en el estudio, y fue aprobado por los comités éticos locales y regionales (CEIC Hospital La Paz, CEI Hospital Infanta Sofía y Comité Ético Local del CSIC) previamente a la inclusión en el estudio. Los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios expresados en la Declaración de Helsinki.

Las características de los pacientes se pueden ver en la *tabla 1*:

Características de los pacientes	Tratados con BCG	Tratados con MMC
<i>n</i>	10	7
Edad en el diagnóstico	73,7 ( $\pm 8,0$ )	70,1 ( $\pm 3,9$ )
Sexo:		
Hombre	8	4
Mujer	2	3
Estadío en el diagnóstico:		
TaG1	-	1
T1G1	-	1
T1G2	-	5
TaG3	1	-
T1G3	5	-
CIS	2	-
TaG3 + CIS	1	-
T1G3 + CIS	1	-
Recidiva:		
No	9	7
Sí	1	-
Exitus:		
No	10	6
Sí	-	1

**Tabla 1.** Características de los pacientes incluidos en el estudio.

Se recogieron muestras de sangre y orina de los pacientes con cáncer de vejiga tratados con BCG y con mitomicina C (MMC, grupo control) a diferentes puntos de tiempos a lo largo del tratamiento (*figura 4*).



**Figura 4.** Calendario de tratamiento con BCG (rosa) o con MMC (azul) de los pacientes de cáncer de vejiga. Las flechas indican las semanas de tratamiento. Se rodean con un círculo los puntos de tratamiento en los que se han recogido muestras de sangre y orina para este estudio. En “Muestra” se detalla la nomenclatura utilizada, correspondiendo el primer dígito al ciclo y el segundo a la semana de tratamiento con BCG (B) o mitomicina (M).

## 1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

68 | A los puntos de tiempo indicados en la *figura 4*, se recogieron muestras de sangre de las dos cohortes de pacientes de cáncer de vejiga incluidas en el estudio.

### 1.1. Análisis de las poblaciones celulares en sangre periférica

Se analizaron las distintas poblaciones celulares por citometría de flujo. Para ello, se realizó la tinción utilizando anticuerpos conjugados directamente sobre 100 µl de sangre, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la tinción, se lisaron los eritrocitos en 1 ml de VersaLyse (Beckmann Coulter) que contenía PFA (Sigma) 2% para, al mismo tiempo, fijar las células. Este paso se realizó en oscuridad durante 30 min. A continuación se analizaron las distintas poblaciones celulares y sus marcadores por citometría de flujo, utilizando un Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter).

### 1.2. Purificación de PBMCs y plasma

La sangre que no fue utilizada para la tinción directa, se utilizó para purificar células mononucleares de sangre periférica y plasma. Para ello, se centrifugó a 1800 rpm durante 15

minutos sin freno. Posteriormente se recogió el plasma y las PBMCs.

El plasma se almacenó en alícuotas de 1 ml a  $-80^{\circ}\text{C}$  para estudios posteriores.

Las PBMCs que se utilizaron en ensayos *in vitro* se volvieron a centrifugar en gradiente de ficoll, tal y como se explica en el *punto 3* de “*Materiales y Métodos*”.

El resto de PBMCs se incubaron durante 2 ciclos de 30 minutos en 1 ml de VersaLyse (Beckmann Coulter) y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  como *pellet* seco para extraer ARN y ADN.

## 2. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE ORINA

---

A los puntos de tiempo indicados en la *figura 4*, se recogieron muestras de orina de las dos cohortes de pacientes de cáncer de vejiga incluidas en el estudio.

### 2.1. Medida de los factores solubles presentes en la orina de pacientes

---

Las muestras de orina se centrifugaron a 400 g para eliminar las células y los cristales. Se analizaron, por duplicado, 50  $\mu\text{l}$  de los sobrenadantes de cada muestra de orina, diluidos 1:2, tal y como está detallado en el *punto 16* de “*Materiales y Métodos*”.

# RESULTADOS

## 1. CÉLULAS TUMORALES DE VEJIGA: CARACTERIZACIÓN Y EFECTO DE BCG

Tras la instilación de BCG en la vejiga de los pacientes con cáncer, la micobacteria se encontrará, en un primer momento, con células uroteliales y, como en toda mucosa, también con células del sistema inmunitario residentes en la vejiga o que se recluten con las sucesivas instilaciones. En una vejiga normal, la micobacteria no tendría acceso directo a las células uroteliales ya que, normalmente, éstas producen una capa de mucinas ricas en glicosaminoglicanos (GAG) (Lilly and Parsons 1990) y uroplakinas (Liang et al. 2001) que las recubren protegiéndolas, principalmente, del pH ácido de la orina y de los compuestos tóxicos que se almacenan en la vejiga. En cambio, en una vejiga que ha sufrido la resección transuretral de un tumor papilar o en la zona de un CIS, esta protección desaparece y la BCG puede acceder hasta las células tumorales sin problema (Coon et al. 2012). Con el fin de conocer el efecto que la micobacteria tiene sobre el reconocimiento de las células uroteliales por las células NK, se comenzó caracterizando diferentes líneas tumorales de vejiga como posibles dianas de estas células citotóxicas para, más adelante, ver el efecto que la BCG tendría sobre su fenotipo y su reconocimiento por estas células.

### 1.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES UROTELIALES

Como ya se adelantó en la introducción, en condiciones de estrés, los niveles de ciertas moléculas en la superficie celular pueden cambiar. Esto ocurre, por ejemplo, con los ligandos del receptor activador NKG2D, cuya expresión aumenta en la superficie de las células tumorales. De esta forma, cuando una célula NK se encuentra con esa célula estresada a consecuencia de la transformación tumoral, reconocerá los ligandos de su receptor en la superficie de la célula diana y se enviarán señales de activación al núcleo para poner en marcha la maquinaria de desgranulación. Por otra parte, los niveles de las moléculas MHC-I, que en condiciones normales inhibirían la respuesta de las células NK tras su reconocimiento a través de sus receptores inhibidores, también pueden verse alterados debido a esta situación de estrés, modificando así la respuesta de las células citotóxicas. Junto a éstas, otras moléculas en la superficie de las células diana también pueden verse alteradas, desempeñando un papel importante en la interacción entre la célula NK y la célula diana. La integración de todas las señales que la célula NK recibe a través de todos sus receptores, tanto activadores como inhibidores, es lo que va a hacer que responda frente a una determinada célula diana o no (revisado en (Long et al. 2013)).

### 1.1.1. Las distintas líneas tumorales de vejiga expresan diferentes patrones de expresión de moléculas capaces de estimular a las células NK

Las células tumorales de vejiga utilizadas en este trabajo proceden de tumores con distinto grado de diferenciación, siendo las líneas T24, UM-UC-3 y J82 las menos diferenciadas (grado 3) y las líneas RT4 y SW780 las más diferenciadas (grado 1) [Tabla 2].

La caracterización de estas células como posibles dianas para las células NK se realizó por citometría de flujo. Para ello, se analizó la expresión de algunas de las principales moléculas activadoras, inhibidoras o de adhesión implicadas en el reconocimiento por las células NK en la superficie de estas células.

Como se puede ver en la *figura 5* y, de una forma más resumida, en la *tabla 2*, las distintas líneas celulares presentan distintos patrones de expresión en superficie de las diferentes moléculas. De esta forma se puede observar que cada línea celular tiene diferentes niveles de expresión de los ligandos para los receptores activadores de las células NK. En la *figura 5.1* están representados los niveles de expresión de los ligandos de NKG2D. Si bien ninguna de las líneas celulares expresa ULBP1 en superficie, la expresión de ULBP2 y ULBP3 es más común entre las distintas líneas, pudiendo variar ligeramente la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés “*Mean Fluorescence Intensity*”) de estas moléculas. Por su parte, la expresión de MICA es mucho más variable: hay líneas celulares, como J82, que expresan niveles muy elevados de esta molécula mientras que otras líneas, como RT-112, no la expresan. Los niveles de expresión de los ligandos para NCRs también son variables. Así, se encuentran desde niveles bajos a niveles medios de los ligandos de NKp46, mientras que los niveles de expresión de los ligandos de NKp30 son, en general, más bajos aunque también más constantes entre las

74 |

		T24	UM-UC-3	J82	RT-112	RT4	SW780
Grado de diferenciación del tumor		3	3	3	2	1	1
Ligandos activadores e inhibidores de las células NK	MICA	+	+	+++	-	+	++
	ULBP1	-	-	-	-	-	-
	ULBP2	++	+	++	++	+	++
	ULBP3	++	+	+	++	++	++
	NKp46L	++	+	+	++	-	+
	NKp30L	+	+	+	+	+	+
	CD48	-	-	-	-	-	-
	E-CADHERINA	-	-	-	++	++	++
	MHC	++	+	+++	-/+	+	++
	HLA C	++	+	+++	-/+	+++	+
Moléculas de adhesión	CD54/ICAM-1	++	+	+++	+	+	+
	CD58/LFA3	++	++	++	+++	++	++
	CD155/PVR	++	++	++	+++	++	+++
	CD112/NECTINA-2	++	+	++	+	+	++
	CD106/VCAM-1	-	-	-	-	-	-

**Tabla 2.** Resumen del nivel de expresión de ligandos activadores, inhibidores y moléculas de adhesión para las células NK en la superficie de las líneas celulares tumorales de vejiga. Nivel de expresión: – no hay expresión, + bajo, ++ medio, +++ alto.

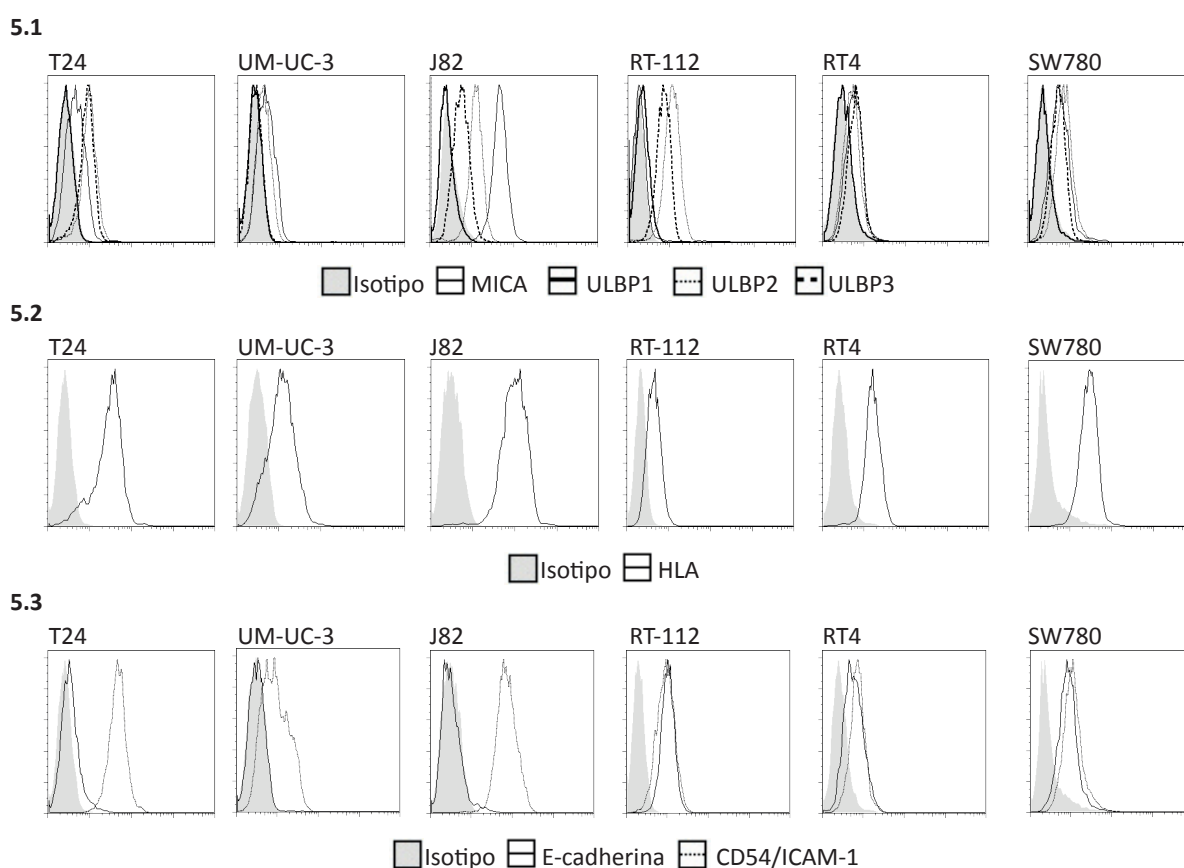


distintas líneas celulares. Por otra parte, no se ha visto expresión de la molécula CD48, ligando del receptor activador 2B4, en ninguna de las líneas celulares.

Lo mismo ocurre con los ligandos de los receptores inhibidores de las células NK. Tras el análisis de los niveles totales de MHC de clase I (*figura 5.2*) y, más específicamente, de los niveles de HLA-C, se ha observado gran variabilidad entre las diferentes líneas: algunas líneas celulares, como J82, expresan niveles muy altos de estas moléculas inhibitoras en su superficie, mientras que otras, como RT-112, tienen niveles muy bajos. Por su parte, la expresión de E-cadherina (*figura 5.3*), que podría tener un papel inhibitor de las células NK a través del receptor inhibidor KLRG1 (Ito et al. 2006), se expresa en las líneas celulares de menor grado tumoral o más diferenciadas, mientras que las líneas de grado 3 no lo expresan.

Por último, se analizaron ciertas moléculas de adhesión que también podrían modular la respuesta de las células NK:

Como se observa en la *figura 5.3*, la molécula CD54 (ICAM-1), que se une a integrinas  $\beta 2$ , como por ejemplo LFA-1, controlando la formación de conjugados (Helander and Timonen 1998; Bryceson et al. 2009), se expresa en todas las líneas celulares aunque con distintos



**Figura 5.** Niveles de expresión en superficie de diferentes ligandos para las células NK, en las distintas líneas tumorales uroteliales. Las distintas líneas tumorales uroteliales T24, UM-UC-3, J82, RT-112, RT4 y SW780 se marcaron para citometría de flujo con anticuerpos contra los diferentes ligandos del receptor activador NKG2D (5.1), las moléculas MHC de clase I (5.2) y la molécula de adhesión E-cadherina (5.3). Histogramas de citometría de flujo representativos de la intensidad media de fluorescencia de las moléculas indicadas ( $n \geq 4$ ).

niveles de expresión. En cualquier caso, esto cumpliría con el primer requisito imprescindible para la adhesión entre la célula NK y su célula diana, aunque el hecho de que cada línea celular cuente con distintos niveles de expresión podría estar modulando esta unión.

Por su parte, la molécula CD58 (LFA-3), que se une a CD2, favorece la adhesión mediada principalmente por la unión entre ICAM-1 y LFA-1 y, por tanto, la respuesta de la célula NK (Barber and Long 2003). Esta molécula se expresa a niveles medios e, incluso, altos (como en el caso de la línea RT-112) en todas las líneas celulares de vejiga.

Todas las líneas celulares expresan niveles variables de CD112 (Nectina-2, PVRL2) y CD155 (Nect5, PVR). Estas moléculas, que se unen al receptor activador DNAM-1 (CD226), también contribuirían a la activación de las células NK (Lakshmikanth et al. 2009; Chan et al. 2010).

Por último, ninguna de las líneas celulares expresaba CD106 (VCAM), molécula que se une a las integrinas  $\alpha 1\beta 4$  de los linfocitos favoreciendo su adhesión (Hemler 1990).

Por tanto, el hecho de que cada línea celular exprese diferentes moléculas en su superficie, en diferentes proporciones, que pueden activar o inhibir a las células NK, hace difícil la estimación exacta de cuál va a ser la respuesta de estas células en presencia de cada célula diana.

#### 76 | 1.1.2. Las células NK activadas reconocen mejor a las células tumorales de vejiga más desdiferenciadas

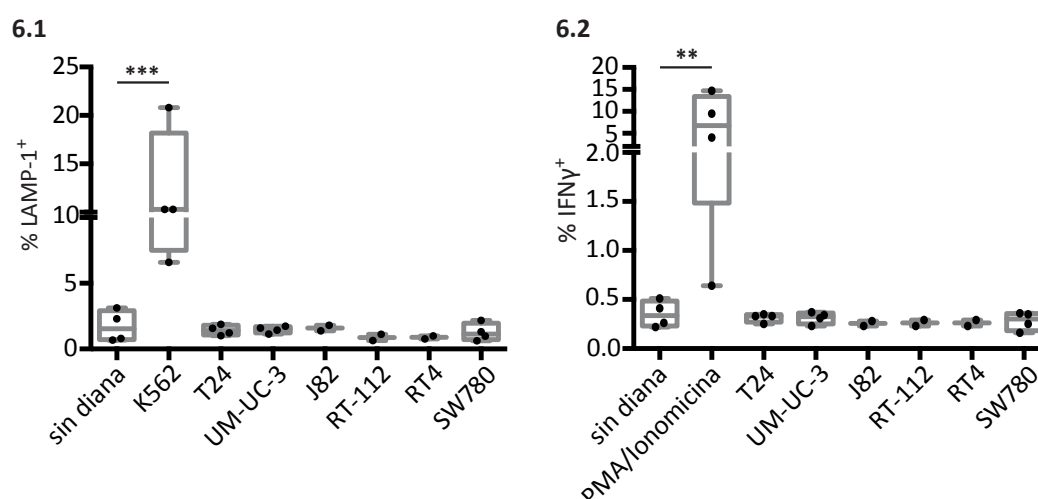
---

La capacidad de las células NK para reconocer y responder frente a las células tumorales de vejiga se midió como la capacidad de estas células para desgranular en contacto con las células tumorales. La desgranulación se detecta como un aumento de la molécula CD107a o LAMP-1 (del inglés "*Lysosomal-associated membrane glycoprotein 1*") en la superficie de la célula NK. LAMP-1 es una molécula que se encuentra en la membrana de los gránulos líticos orientada hacia el interior y, sólo cuando éstos se fusionan con la membrana plasmática durante la desgranulación de la célula NK, se queda expuesta en su superficie.

En este primer ensayo de desgranulación, se co-incubaron células NK recién purificadas con las distintas líneas celulares tumorales y con la línea K562, utilizada como control positivo de la capacidad de respuesta de las células NK, a una ratio 1:2 (efectora : diana) durante 6 horas en presencia de monensina. Transcurrido ese tiempo, las células NK se analizaron por citometría de flujo para examinar la presencia de LAMP-1 en su superficie. Como se observa en la *figura 6.1*, las células NK no fueron capaces de responder frente a ninguna de las líneas tumorales de vejiga, mientras que sí lo hicieron, aunque a un nivel bajo, frente a las células control K562.

A su vez, se estudió la capacidad de estas células NK recién purificadas para producir

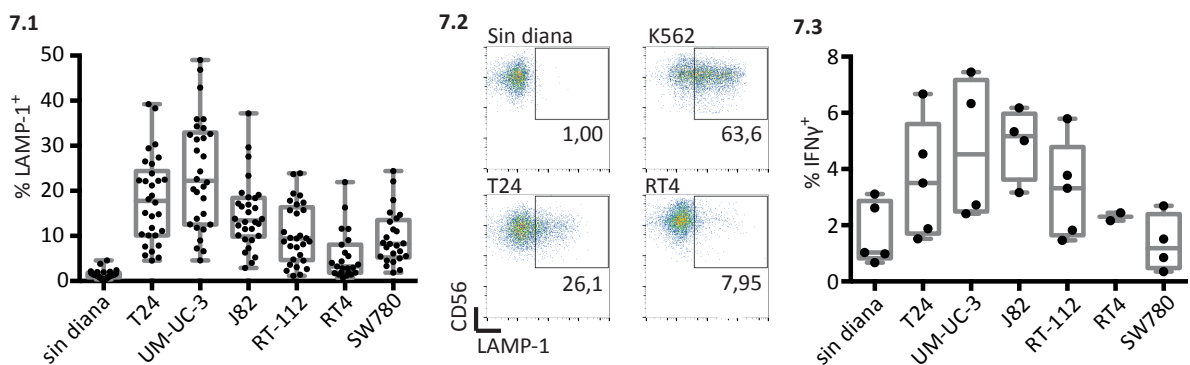
IFN $\gamma$  en respuesta a las distintas líneas celulares tumorales, ya que se ha descrito que, recién purificadas, las células NK CD56<sup>dim</sup> tienen niveles elevados de ARNm de IFN $\gamma$ , lo que les permite responder rápidamente (De Maria et al. 2011). Para ello, se co-incubaron las células NK recién purificadas con las distintas líneas celulares tumorales a una ratio 1:2 (efectora : diana) durante 6 horas en presencia de monensina. Como control positivo, se incubaron las células NK recién purificadas sin células diana pero con PMA e ionomicina. Tras ese tiempo de co-incubación, las células NK se fijaron y permeabilizaron para poder analizar la cantidad de IFN $\gamma$  que habían producido en respuesta a las células tumorales de vejiga por citometría de flujo intracelular. Al igual que en el caso anterior, y como se observa en la *figura 6.2*, sólo se obtuvo una respuesta mediada por IFN $\gamma$  en el control positivo, en este caso de PMA / ionomicina, pero no en la incubación con las células tumorales.



**Figura 6.** Reconocimiento de las células tumorales de vejiga por parte de las células NK recién purificadas. Experimentos de desgranulación (6.1) y de producción de IFN $\gamma$  (6.2). Las células NK se co-incubaron a una ratio 1:2 (efectora : diana) con las distintas líneas tumorales de vejiga, así como con la línea K562 (6.1) o en presencia de PMA e ionomicina (6.2) como controles positivos, durante 6h. Se midió el porcentaje de células desgranulando como el %LAMP-1<sup>+</sup> y el porcentaje de células que producen IFN $\gamma$  como el %IFN $\gamma$ <sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. Los datos se representan en diagramas de cajas. Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes. Para el análisis estadístico se aplicó ANOVA de un factor, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001. (n=4 sin diana, K562, T24, UM-UC-3, SW780; n=2 J82, RT-112, RT4).

Dado que las células NK recién purificadas no eran capaces de responder frente a las células tumorales uroteliales, se decidió empezar a trabajar con líneas de células NK primarias, que están activadas debido a que se mantienen en cultivo en presencia de IL-2 y células tumorales irradiadas. De nuevo, se repitieron los experimentos de desgranulación, pero esta vez co-incubando las células NK con las líneas de células tumorales de vejiga y con las células K562, utilizadas una vez más como control positivo (datos no mostrados), a una ratio 1:2 (efectora : diana). Transcurrido ese tiempo, las células NK se analizaron por citometría de flujo para examinar la presencia de LAMP-1 en su superficie. Como se puede observar en la *figura 7.1*, esta vez las células NK activadas fueron capaces de reconocer a las células tumorales uroteliales

y responder frente a ellas. A pesar de las variaciones entre donantes, este experimento se ha repetido en numerosas ocasiones y siempre se ha obtenido el mismo patrón de respuesta. Las líneas celulares T24, UM-UC-3 y J82, que presentan una menor diferenciación y, por tanto, un mayor grado tumoral, estimulan una desgranulación en las células NK mayor que la observada en respuesta a las líneas celulares RT-112, RT4 y SW780, que son líneas con un grado tumoral más bajo (*figura 7.2*). La respuesta de las células NK frente a estas líneas celulares es independiente de MHC-I ya que, más adelante, se verá cómo el bloqueo de esta molécula apenas modifica la capacidad de desgranulación de las células NK, sin afectar al patrón de reconocimiento de las distintas líneas celulares (*figura 9.2*).

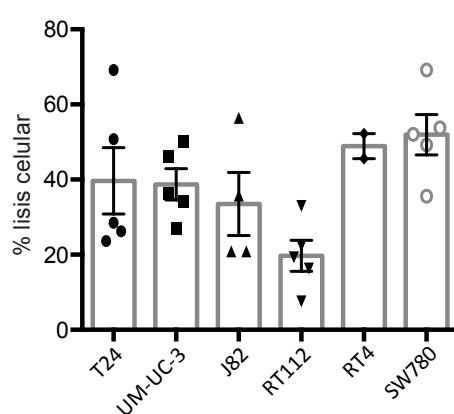


**Figura 7.** Reconocimiento de las células tumorales de vejiga por parte de células NK procedentes de líneas primarias cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2. **7.1.** Experimentos de desgranulación. Las células NK se co-incubaron a una ratio 1:2 (efectora : diana) con las distintas líneas tumorales de vejiga durante 2h. Se midió el porcentaje de células desgranulando como %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. (n≥23 para todas las líneas). **7.2.** Gráficos de citometría representativos de los ensayos de desgranulación en ausencia de célula diana o cuando tienen como célula diana una diana clásica, K562, una línea de cáncer de vejiga de alto grado, T24, o una línea de cáncer de vejiga de bajo grado, RT4. **7.3.** Experimentos de producción de IFNγ. Las células NK se incubaron con las distintas líneas tumorales de vejiga a una ratio 1:2 (efectora : diana) durante 6h. Se midió el porcentaje de células que producen IFNγ como el %IFNγ<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. (n=4 para todas las líneas excepto para RT4, donde n=2). **7.1 y 7.3.** Los datos se muestran en diagramas de cajas. Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes.

A continuación, se realizaron también ensayos de producción de IFNγ con estas líneas primarias de células NK activadas, y, para ello, se co-incubaron las células NK con las distintas líneas celulares tumorales a una ratio 1:2 (efectora : diana) durante 6 horas en presencia de monensina. Una vez más, como control positivo, las células NK se incubaron sin células diana en presencia de PMA e ionomicina (datos no mostrados). Tras ese tiempo, se analizó por citometría de flujo intracelular la cantidad de IFNγ que habían producido en respuesta a las células tumorales de vejiga. Al igual que ocurría con la desgranulación, y como se puede observar en la *figura 7.3*, en estas condiciones las células NK activadas también fueron capaces de producir IFNγ en respuesta a las líneas tumorales de vejiga, pero esta respuesta no era igual para todas las líneas: una vez más, las líneas celulares T24, UM-UC-3 y J82 estimularon una mayor producción de IFNγ en las células NK, mientras que la respuesta era menor cuando las células NK se incubaban con las líneas RT-112, RT4 y SW780.

### 1.1.3. Las células tumorales de vejiga más diferenciadas son más sensibles a la lisis mediada por las células NK

En paralelo a los ensayos anteriores, se estudió también el efecto que el reconocimiento y la respuesta de las células NK tenía sobre las células diana. Para ello, se realizaron experimentos de lisis celular, similares a los experimentos clásicos de citotoxicidad con  $^{51}\text{Cr}$ , pero en este caso marcando las células con calceína AM. Una vez cargadas con calceína, estas células se incubaron con células NK activadas con IL-2 a distintos ratios efectora : diana durante 4 horas y, tras ese tiempo, se recogió el sobrenadante, se midió la fluorescencia y se calculó el porcentaje de lisis celular. De esta forma, cuanto mayor fluorescencia se detecte en el sobrenadante, mayor habrá sido la lisis celular. Tras probar diferentes ratios efectora : diana (datos no mostrados), se concluyó que las diferencias eran más claras cuando la ratio efectora : diana era 10:1, por lo que se decidió utilizar esta ratio para los experimentos posteriores. Como se puede observar en la *figura 8*, exceptuando a la línea RT-112, todas las líneas tumorales de vejiga fueron susceptibles a la lisis mediada por las células NK. El hecho de que las líneas más diferenciadas, RT4 y SW780, fueran más susceptibles a la lisis mediada por las células NK, a pesar de ser las que menos desgranulación producían en estas células, se podría explicar por el papel que podrían tener otros mecanismos de muerte promovidos por las células NK e independientes de la desgranulación, como puede ser a través de la interacción de FasL, TRAIL o TNF $\alpha$  con sus respectivos receptores, o también por mecanismos de resistencia a la citotoxicidad en las células tumorales.



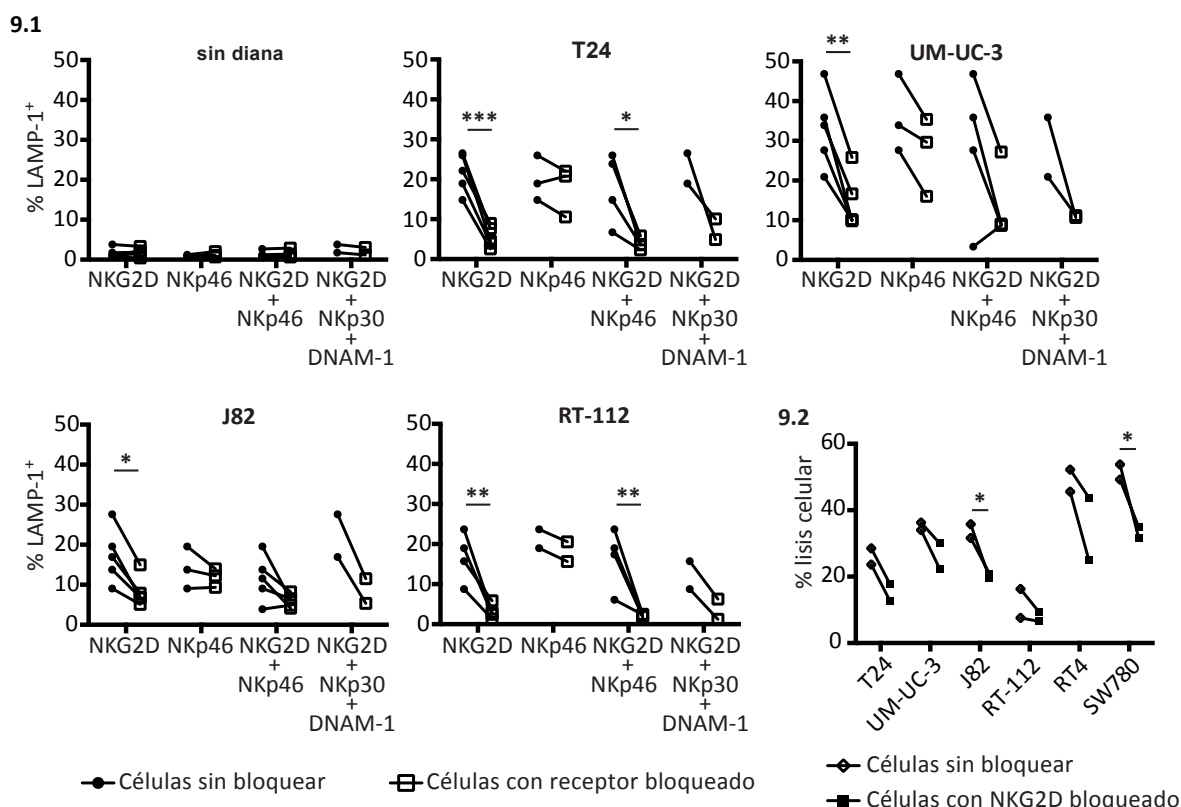
**Figura 8.** Lisis de las células tumorales de vejiga mediada por células NK procedentes de líneas primarias cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2. Las células tumorales, cargadas con calceína fluorescente, se co-incubaron con células NK durante 4 horas a una ratio 10:1 (efectora : diana). La lisis de las células provoca la liberación de la calceína al medio. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la fluorescencia de la calceína liberada en los sobrenadantes. Se midió la lisis debida al efecto de las células NK como porcentaje de la liberación máxima, que es la calceína que se libera cuando las células tumorales se lisan con un detergente (SDS), teniendo en cuenta la liberación espontánea, que es la calceína liberada por estas células si no han sido incubadas con células efectoras [(observada-espontánea)/(max-espontánea)]. Se representa la media y la SEM.

Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes ( $n \geq 4$  para todas las líneas excepto para RT4, donde  $n=2$ ).

### 1.1.4. El reconocimiento de las células tumorales de vejiga por parte de las células NK está mediado, principalmente, por NKG2D

Debido a la gran variedad de receptores que pueden modular la respuesta de las células NK, y dado que las distintas líneas tumorales de vejiga expresan un panel amplio y diferente de moléculas que, potencialmente, podrían estimular la respuesta de estas células, se decidió estudiar qué receptores estaban involucrados en esa respuesta. Para ello, se bloquearon

diferentes receptores activadores en las células NK con anticuerpos monoclonales específicos para NKG2D, Nkp46, Nkp30 y DNAM-1. Una vez bloqueados, se repitió el experimento de desgranulación, co-incubando 2h las células tumorales de vejiga con las líneas de células NK bloqueadas y sin bloquear. Transcurrido ese tiempo, las células NK se analizaron por citometría de flujo para examinar la presencia de LAMP-1 en su superficie. Como se observa en la *figura 9.1*, el receptor NKG2D es el que desempeña un papel principal ya que, cuando está bloqueado, disminuye en gran medida el porcentaje de células que desgranulan en respuesta a todas las líneas tumorales de vejiga. El bloqueo del receptor activador Nkp46, también parece afectar a la respuesta de las células NK, aunque de una manera más moderada y es que, a pesar de no haber diferencias estadísticamente significativas, hay una tendencia clara. El efecto del bloqueo de Nkp46, se aprecia mejor cuando se bloquea junto con NKG2D, y es que no es la primera vez que se describe la importancia de la sinergia entre diferentes receptores en la activación



**Figura 9.** Efecto del bloqueo de diferentes receptores activadores en las células NK procedentes de líneas primarias cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2 sobre el reconocimiento de las células tumorales de vejiga. **9.1.** Se bloquearon en las células NK los receptores NKG2D, Nkp46, Nkp30 y DNAM-1, de manera individual o en combinación, según se indica en la gráfica, y se co-incubaron a una ratio 1:2 (efectora : diana) junto con las células tumorales de vejiga durante 2h. Se indica el porcentaje de células NK que está desgranulando como %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. (n=5  $\alpha$ NKG2D, n=3  $\alpha$ Nkp46, n=5  $\alpha$ NKG2D +  $\alpha$ Nkp46, n=2  $\alpha$ NKG2D +  $\alpha$ Nkp30 +  $\alpha$ DNAM-1). **9.2.** Se bloqueó el receptor NKG2D en las células NK y se co-incubaron, a una ratio 10:1 (efectora : diana), con células tumorales de vejiga pre-cargadas con calceína, durante 4h. Transcurrido el tiempo de incubación, se recogieron los sobrenadantes y se midió la fluorescencia de la calceína liberada. Se midió la lisis debida al efecto de las células NK como porcentaje del máximo, que es la calceína que se libera cuando las células tumorales se lisan con un detergente (SDS), teniendo en cuenta la liberación espontánea, que es la calceína liberada por estas células si no han sido incubadas con células efectoras [(observada-espontánea)/(max-espontánea)]. (n=2) **9.1. y 9.2.** Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student, \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001.

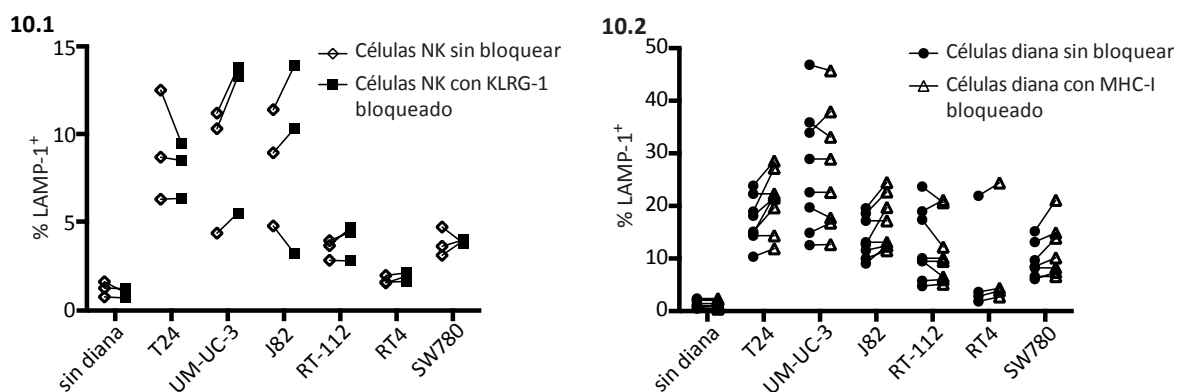
de las células NK (Bryceson et al. 2006). A pesar de no haber diferencias estadísticamente significativas, los porcentajes de células desgranulando cuando ambos receptores están bloqueados son más bajos frente a todas las líneas tumorales que los de las células que sólo tienen bloqueado NKG2D. Por último, los receptores NKp30 y DNAM-1, a pesar de estar bloqueados junto con NKG2D, no parecen aportar un descenso mayor en la desgranulación de las células bloqueadas para este receptor, como ocurría con el receptor NKp46.

El importante papel del receptor NKG2D en el reconocimiento y la eliminación de las células tumorales también se ha comprobado mediante ensayos de citotoxicidad con estas células. Para ello, las células tumorales de vejiga cargadas con calceína se incubaron con células NK, cuyo receptor NKG2D había sido previamente bloqueado o no, a una ratio 10:1 durante 4 horas. Tras el tiempo de incubación, se recogió el sobrenadante y se midió la fluorescencia. La *figura 9.2* muestra una disminución importante en el porcentaje de células tumorales que se lisan por efecto de las células NK cuando el receptor NKG2D está bloqueado, confirmando así la importancia de este receptor en el reconocimiento de las células tumorales de vejiga.

Por otra parte, es destacable el hecho de que las células de mayor grado tumoral sean las que producen una mayor activación de las células NK y, a su vez, carezcan de la molécula E-cadherina en su superficie. Por su parte, las células más diferenciadas, que expresan más E-cadherina, provocan una menor activación de las células NK. Puesto que se ha descrito que la E-cadherina podría desempeñar un papel inhibitorio en la activación de las células NK tras interactuar con su receptor KLRG-1 (Ito et al. 2006), se decidió estudiar el papel de dicha interacción en este sistema. Para ello, se bloqueó el receptor KLRG-1 en las células NK antes de co-incubarlas durante 2h con las células tumorales de vejiga para comprobar si se producían cambios en la desgranulación. Sin embargo, como se observa en la *figura 10.1*, el bloqueo del receptor KLRG-1 no aumentó la respuesta de las células NK frente a las líneas tumorales uroteliales de menor grado tumoral por lo que se descarta que pueda contribuir a la inhibición de las células NK en este sistema.

Por otra parte, las células NK utilizadas pueden tener diferentes receptores KIR, dependiendo del tipaje del donante. Esto va a condicionar también su respuesta frente a las diferentes dianas, de tal forma que se podrá ver inhibida, si cuenta con KIR inhibidores, o activada, si son KIR activadores, en presencia del alelo de MHC adecuado. De igual manera, el tipaje de las moléculas MHC en la célula diana puede afectar el reconocimiento por diferentes KIR de las células NK. Por eso, con el fin de eliminar todas estas posibles variables, y ya que no se han genotipado para KIR y HLA todas las líneas de células NK y las células diana, se estudió la diferencia que había en la desgranulación de las células NK cuando se enfrentaban a las distintas líneas tumorales si en éstas se había bloqueado previamente las moléculas MHC de clase I. Para ello, se incubaron las células tumorales de vejiga con un anticuerpo anti-HLA de clase I y se repitieron los ensayos de desgranulación. Como se puede observar en la *figura 10.2*, a pesar de haber cierta variabilidad, en general, hubo un ligero aumento en la respuesta de





**Figura 10.** Efecto del bloqueo de diferentes receptores inhibidores importantes en el reconocimiento de las células tumorales de vejiga por las células NK procedentes de líneas primarias cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2. Se analizó el efecto que tenía, por una parte, el bloqueo del receptor de E-cadherina, KLRG-1, en las células NK (**10.1**) y, por otra, el bloqueo de las moléculas MHC-I en las células tumorales de vejiga (**10.2**) en la capacidad de las células NK para desgranular en respuesta a las células tumorales. Una vez bloqueadas las células correspondientes, se co-incubaron las células NK, a una ratio 1:2 (efectora : diana), con las células tumorales de vejiga durante 2h. Se midió el porcentaje de células NK desgranulando como %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. **10.1 y 10.2.** Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes. Para el análisis estadístico, se aplicó ANOVA de varios factores, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. (**10.1** n=3), (**10.2** n≥8).

las células NK cuando las moléculas MHC están bloqueadas en las células diana. En cualquier caso, el patrón de respuesta sigue siendo el mismo: las líneas de mayor grado tumoral inducen una mayor respuesta por parte de las células NK, mientras que las líneas de grado más bajo inducen menos desgranulación. De esta forma, queda confirmado que los diferentes niveles de respuesta de éstas células se deben a la distinta capacidad que cada línea de células tumorales tiene para estimular a las células NK, y no a la variación entre donantes.

A pesar de no haber grandes diferencias debidas al bloqueo de HLA, pero con el fin de evitar que el efecto mediado por MHC pueda enmascarar cualquier otro efecto en los experimentos siguientes, se decidió bloquear siempre las moléculas MHC-I al enfrentar células NK y células tumorales uroteliales.

## 1.2. EFECTO DE BCG EN LAS CÉLULAS TUMORALES DE VEJIGA

Como ya se mencionó en la introducción, la teoría de la inmunovigilancia (Burnet 1967) apoya el hecho de que cuando una célula sufre una transformación tumoral, los cambios producidos en ella son capaces de alertar a las células del sistema inmunitario, entre ellas a las células NK. Según esta teoría, en la mayoría de los casos, las células inmunitarias son capaces de reconocerlas y eliminarlas. Pero, en ocasiones, las células tumorales desarrollan mecanismos que les permiten escapar de esta vigilancia. En el caso estudiado en este trabajo, ya se ha visto cómo las células NK que no han sido previamente activadas, no son capaces de reconocer como células extrañas a las distintas células tumorales uroteliales a pesar del amplio



panel de moléculas que expresan en su superficie. En cambio, una vez que las células NK están activadas, en este caso en presencia de IL-2, sí que son capaces de reconocerlas y eliminarlas. Así, según la teoría de la inmunoección (Dunn et al. 2002), el hecho de que las células NK sin activar no sean capaces de reconocerlas y responder, podría explicar, en parte, el hecho de que se hayan podido generar los tumores de los que se aislaron las células tumorales utilizadas en este estudio, ya que fueron capaces de escapar de la vigilancia del sistema inmunitario para desarrollarse como tumor. Sin embargo, el uso de la inmunoterapia con BCG para el cáncer de vejiga permite, en cierta manera, que las células del sistema inmunitario reconozcan a las células tumorales y las eliminen. Como ya se mencionó en la introducción, el éxito de esta terapia se da en un 70% de los casos, habiendo un 30% de los pacientes tratados que no responde a ella. Por tanto, conocer el mecanismo de acción de la micobacteria en este sistema sería muy útil en cuanto a la posibilidad de mejorar la terapia en los pacientes que responden y, sobre todo, a poder adaptarla a las necesidades de aquellos pacientes que no respondan.

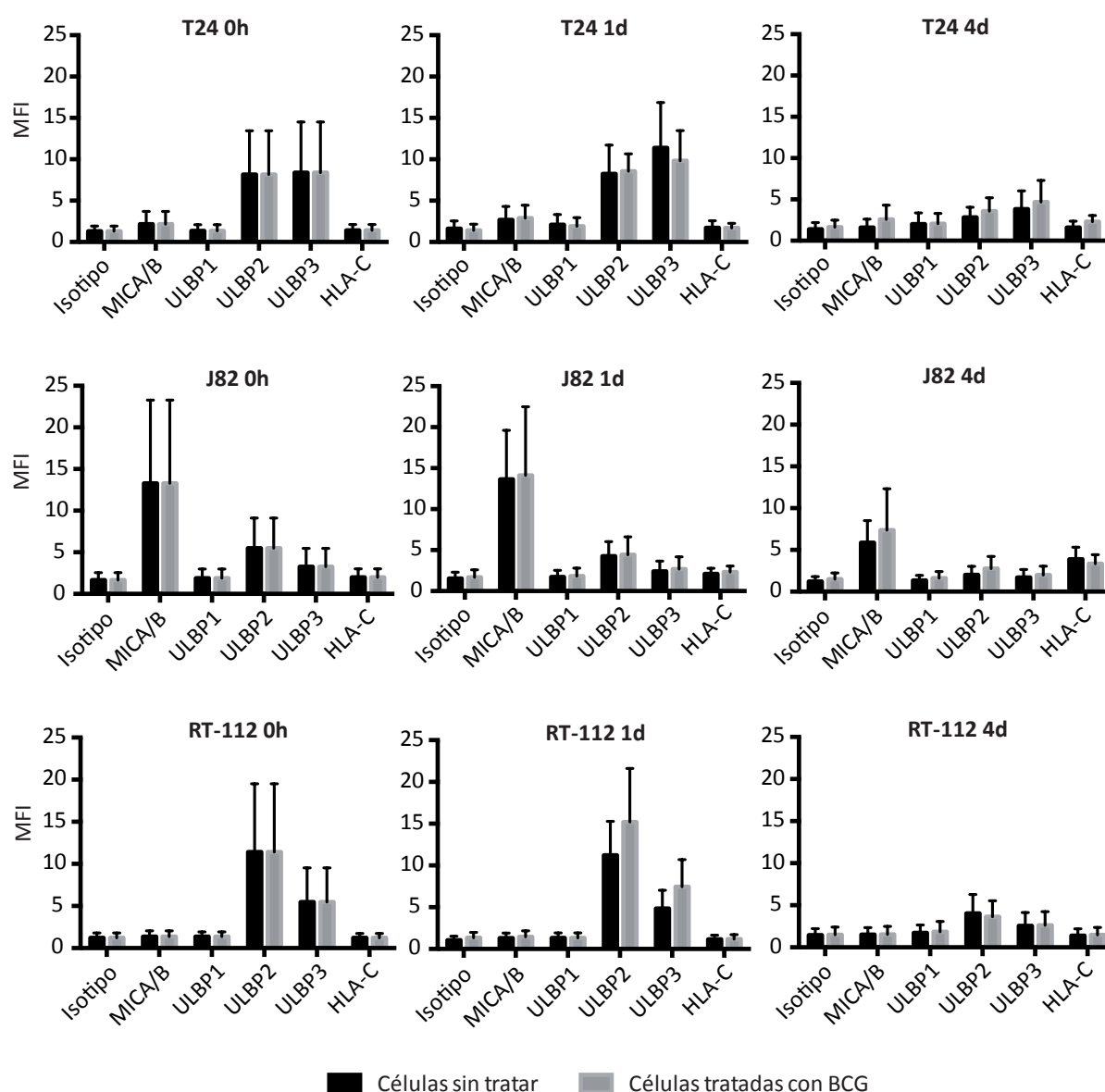
### 1.2.1. El tratamiento con BCG no altera la expresión de los ligandos de NKG2D en las células tumorales uroteliales

La respuesta de la célula NK va a depender de que, tras la integración de todas las señales que recibe a través de su amplio panel de receptores activadores e inhibidores, se supere un umbral determinado de activación. Este umbral será más o menos alto en función del estadio de activación “basal” de la célula NK. Por eso, las células NK que ya estaban activadas con IL-2 fueron capaces de reconocer y de responder frente a las células tumorales uroteliales (*figura 7.1*), mientras que las células NK recién purificadas no pudieron (*figura 6.1*), a pesar de que en ambos casos las células diana tenían las mismas moléculas activadoras e inhibidoras. Una forma de alcanzar este umbral, en el caso de las células NK recién purificadas, podría ser por un aumento de moléculas activadoras o por un descenso de moléculas inhibidoras en la superficie de las células tumorales uroteliales.

Dado que en el tratamiento con BCG, la micobacteria se encontrará como primera barrera precisamente a las células tumorales uroteliales, se decidió empezar por estudiar el efecto directo que la micobacteria tenía sobre estas células. Estudios previos indicaban que la incubación de diferentes líneas celulares uroteliales con diferentes tipos de bacterias provocaban ciertas respuestas que podrían modular el reconocimiento por las células NK. Por ejemplo, experimentos en los que se había incubado la línea J82 con otra bacteria, *E. coli* Hu734, demostraban un aumento en la liberación de IL-6 e IL-8 además del aumento en los niveles de ARNm de estas citoquinas junto con IL-1 $\beta$  (Hedges et al. 1994). Además, se ha descrito que el co-cultivo con BCG de las líneas T24 y RT-112 aumenta el ARNm de los ligandos de NKG2D, MICB y ULBP1, haciéndolas más susceptibles a la lisis por células asesinas activadas por linfoquinas o LAK (del inglés “*Lymphokine-Activated Killer cells*”) (Miyazaki et al. 2011).

Estos datos sugieren que, en la inmunoterapia con BCG, los cambios que se producen en las células tumorales uroteliales, como consecuencia del contacto con la micobacteria, podrían estar modulando la respuesta del sistema inmunitario.

Por tanto, se quiso comprobar si, tras el tratamiento con BCG, se producía un aumento en la expresión de los ligandos de NKG2D en la superficie de las células tumorales de vejiga. Para ello, se incubaron las células tumorales de vejiga en presencia y ausencia de BCG a una ratio 2:1 (BCG : célula tumoral urotelial) durante 4 días y se analizó, por citometría de flujo, a tiempos 0, 1 día y 4 días si había diferencias en los niveles de expresión de los ligandos de NKG2D y de HLA-C. En estos experimentos se utilizó la cepa Tice de BCG. Como se observa en



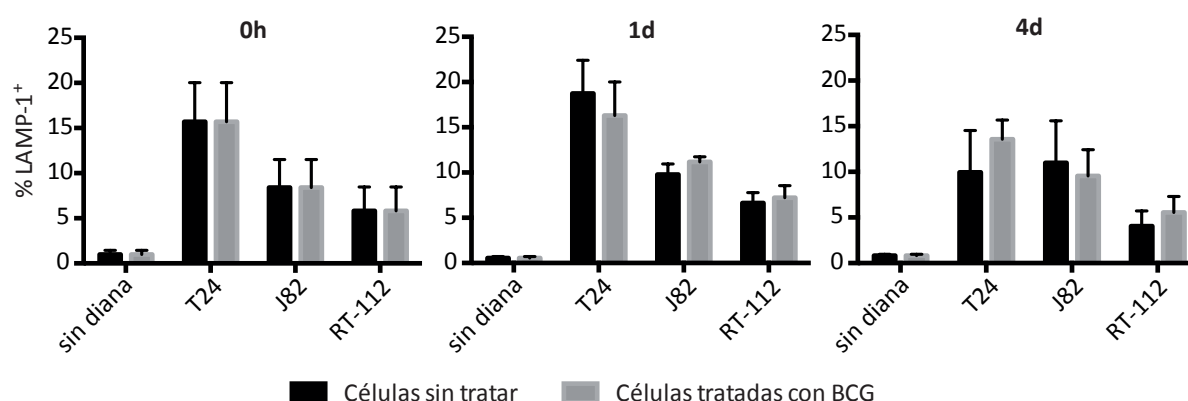
**Figura 11.** Efecto de BCG en los niveles de expresión de los ligandos del receptor activador NKG2D y de la molécula MHC de clase I, HLA-C, tras la co-incubación con las líneas tumorales de vejiga. Se co-incubaron las líneas tumorales uroteliales T24, J82 y RT-112 durante hasta 7d en presencia y ausencia de BCG. A los tiempos indicados, se compararon los niveles de expresión de las moléculas estudiadas, en las distintas líneas celulares. Se representan la media y la SEM para cada molécula. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. (n=3).

la *figura 11*, no hubo diferencias significativas en los niveles de expresión de las moléculas estudiadas debido al tratamiento con BCG hasta el día 4. Por otra parte, el tratamiento con BCG tampoco afectó a la proliferación de las células tumorales (datos no mostrados) ya que, a día 4, las células estaban ya casi confluentes en ambas condiciones, tanto estimuladas como sin estimular con BCG.

### 1.2.2. El tratamiento con BCG no altera el reconocimiento de las células tumorales uroteliales por parte de las células NK

En ausencia de BCG, el receptor de las células NK que desempeña un papel principal en el reconocimiento de las células tumorales uroteliales es NKG2D. Sin embargo, podría ocurrir que, tras la incubación de estas células con BCG, otras moléculas, ligandos para otros receptores, ganasen importancia favoreciendo así su reconocimiento por las células NK. Por tanto, para investigar si el tratamiento con BCG está provocando algún cambio importante en la expresión de estas moléculas, se realizaron ensayos funcionales con células NK. Tras incubar las células tumorales uroteliales en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 2:1 (BCG : célula tumoral urotelial), durante diferentes tiempos (0, 1 día y 4 días), se realizaron ensayos de desgranulación con células NK de líneas primarias establecidas. Sin embargo, como se puede observar en la *figura 12*, no se detectaron diferencias significativas entre la desgranulación de las células NK tras ser expuestas a células tumorales uroteliales tratadas o sin tratar con BCG.

| 85



**Figura 12.** Efecto de BCG en el reconocimiento de las células tumorales uroteliales por las células NK procedentes de líneas primarias cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2. Se co-incubaron las líneas tumorales uroteliales T24, J82 y RT-112 durante hasta 7d en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 2:1 (BCG : célula urotelial). A los tiempos indicados, se realizaron experimentos de desgranulación co-incubando células NK a una ratio 1:2 (efectora : diana) con las distintas líneas tumorales de vejiga, cuyas moléculas MHC de clase I habían sido bloqueadas previamente, durante 2h. Se mide el porcentaje de células desgranulando como %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. Se representan la media y la SEM para cada condición. Para el análisis estadístico, se aplicó ANOVA de varios factores, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. (n=3).

Dado que es muy difícil calcular la ratio real bacteria : célula tumoral urotelial que hay en la vejiga, se probaron diferentes ratios BCG : célula tumoral urotelial (1:1 – 10:1) tanto para comprobar si había cambios a nivel fenotípico en las células uroteliales, como para ver si los

había en el reconocimiento de estas células por parte de las células NK. Además, se utilizaron diferentes cepas de BCG aparte de la Tice: la cepa danesa (Danish 1331) y la cepa Connaught. En todos los casos, los resultados fueron parecidos: no se detectaron cambios en los niveles de expresión de las moléculas de superficie estudiadas en las células tumorales uroteliales, ni en el reconocimiento de estas células por parte de las células NK.

## 2. CÉLULAS NK PURIFICADAS: EFECTO DE BCG EN CÉLULAS NK RECIÉN PURIFICADAS Y EN LÍNEAS DE CÉLULAS NK PRIMARIAS

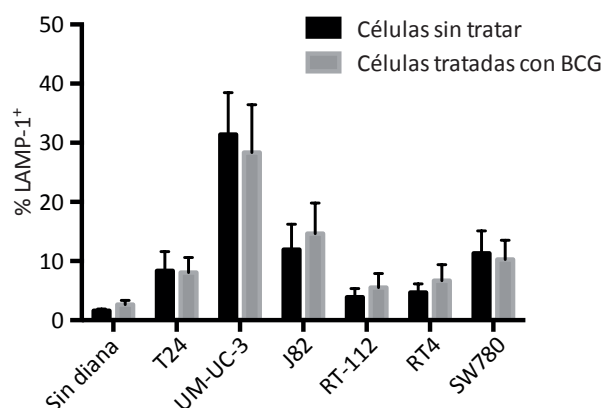
Dado que la presencia de BCG no producía cambios en las células tumorales uroteliales que modificasen su reconocimiento por parte de las células NK, se decidió estudiar el efecto que la micobacteria tenía sobre estas células citotóxicas. En la introducción ya se adelantó que las células NK desempeñan un papel muy importante en el éxito del tratamiento con BCG del cáncer de vejiga superficial. Así, ya en 2001, Brandau y sus colaboradores demostraron *in vitro* que las células NK, tras la estimulación con BCG, adquieren la capacidad de responder y eliminar células tumorales, entre ellas, la línea T24. Por otra parte, en experimentos *in vivo*, vieron que, en los ratones tratados con BCG, se producía un reclutamiento importante de células NK a la vejiga; y que, si bien en ratones C57BL/6 *wild-type* con tumores ortotópicos de vejiga la supervivencia pasaba de un 20% a un 60% tras el tratamiento con BCG, en ratones *beige*, deficientes en la respuesta citotóxica y, por tanto, en la respuesta de las células NK, no había diferencias entre la supervivencia de los ratones sin tratar y los ratones tratados con BCG (Brandau and Böhle 2001; Brandau et al. 2001).

### 2.1. EFECTO DE BCG EN LÍNEAS DE CÉLULAS NK PRIMARIAS

Como se ha visto en el apartado 1, las células NK mantenidas *in vitro* y activadas con IL-2 y células tumorales irradiadas, son capaces de reconocer y responder frente a varias líneas de células tumorales uroteliales.

El hecho de que BCG no provoque ningún efecto sobre las células tumorales uroteliales que modifique su reconocimiento por las células NK, y dada la importancia que las células NK tienen en la inmunoterapia con BCG, apoyaría la idea de que la bacteria podría estar provocando algún cambio directamente en las células efectoras. Así, se decidió estudiar el efecto que la micobacteria tenía sobre las células NK con el fin de conocer si éstas eran capaces de responder de una manera más eficiente frente a las células tumorales uroteliales. Para ello, se incubaron células NK procedentes de líneas de células NK primarias en presencia o ausencia de BCG, a una ratio 1:1, durante 4 días para, tras ese tiempo, utilizarlas como células efectoras en ensayos de desgranulación con las células tumorales uroteliales. Como se observa en la

figura 13, el tratamiento con BCG no produjo ningún cambio en la respuesta de las células NK, que ya estaban previamente activadas con IL-2, frente a las células tumorales uroteliales.



**Figura 13.** Efecto de BCG en la capacidad de las células NK, procedentes de líneas primarias cultivadas *in vitro* en presencia de IL-2, para reconocer y responder a diferentes líneas celulares uroteliales. Se co-incubaron las células NK de diferentes donantes durante 4 días en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:1 (BCG : célula NK). Tras ese tiempo, se realizaron experimentos de desgranulación co-incubando células NK a una ratio 1:2 (efectora : diana) con las distintas líneas tumorales de vejiga, cuyas moléculas MHC de clase I habían sido bloqueadas previamente, durante 2h. Se midió el porcentaje de células desgranulando como %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de

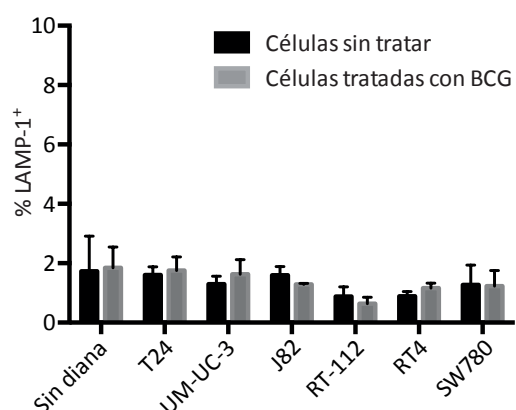
flujo. Se representan la media y la SEM para cada condición. Para el análisis estadístico, se aplicó ANOVA de varios factores, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. (n=4).

Estos datos demuestran que, una vez que las células NK están activadas, la micobacteria no provoca ningún cambio en su capacidad para reconocer a las células tumorales. Por lo tanto, la importancia de la micobacteria en este sistema podría residir en su capacidad para activar a las células NK.

## 2.2. EFECTO DE BCG EN LAS CÉLULAS NK RECIÉN PURIFICADAS

| 87

Hasta ahora se ha visto que cuando no se aplica ningún estímulo a las células NK recién purificadas, éstas no son capaces de responder frente a las células tumorales uroteliales (figura 6.1), mientras que, una vez activadas con IL-2, ya sí que son capaces de reconocerlas y eliminarlas (figura 7.1 y figura 8). Con el fin de estudiar si BCG afecta de manera directa al proceso de activación de las células NK, se incubaron estas células recién purificadas en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:1, durante 2 días. Tras ese tiempo, se realizaron ensayos de desgranulación durante 6 horas en presencia de monensina. Sin embargo, como se observa en la figura 14, la incubación con BCG no fue estímulo suficiente para provocar que las



**Figura 14.** Efecto de BCG en la capacidad de las células NK recién purificadas para reconocer y responder a diferentes líneas celulares uroteliales. Se co-incubaron las células NK de diferentes donantes durante 4 días en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:1 (BCG : célula NK). Tras ese tiempo, se realizaron experimentos de desgranulación co-incubando células NK a una ratio 1:2 (efectora : diana) con las distintas líneas tumorales de vejiga, cuyas moléculas MHC de clase I habían sido bloqueadas previamente, durante 6h. Se midió el porcentaje de células desgranulando como %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> por citometría de flujo. Se representa la media y la desviación típica para cada condición. Para el análisis estadístico, se aplicó ANOVA de varios factores, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. (n=4, excepto para J82, RT-112 y RT4 donde n=2).

células NK recién aisladas alcanzasen el estadio de activación necesario para poder reconocer a las células tumorales uroteliales y responder frente a ellas.

Dado que las células NK son muy importantes para el éxito de la inmunoterapia con BCG (Brandau and Böhle 2001; Brandau et al. 2001), que además hemos visto cómo estas células, una vez activadas con IL-2 *in vitro*, son capaces de reconocer a las células tumorales uroteliales y eliminarlas; y a pesar de que la bacteria sola parece no ser capaz de activar a las células NK de manera directa, es posible que el papel de la BCG sea modular los eventos intermedios que llevan al reclutamiento y a la activación de estas células citotóxicas, probablemente en el contexto de otras poblaciones celulares.

### 3. PBMCs Y CÉLULAS NK: EFECTO DE BCG EN LAS CÉLULAS NK EN EL CONTEXTO DEL TOTAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

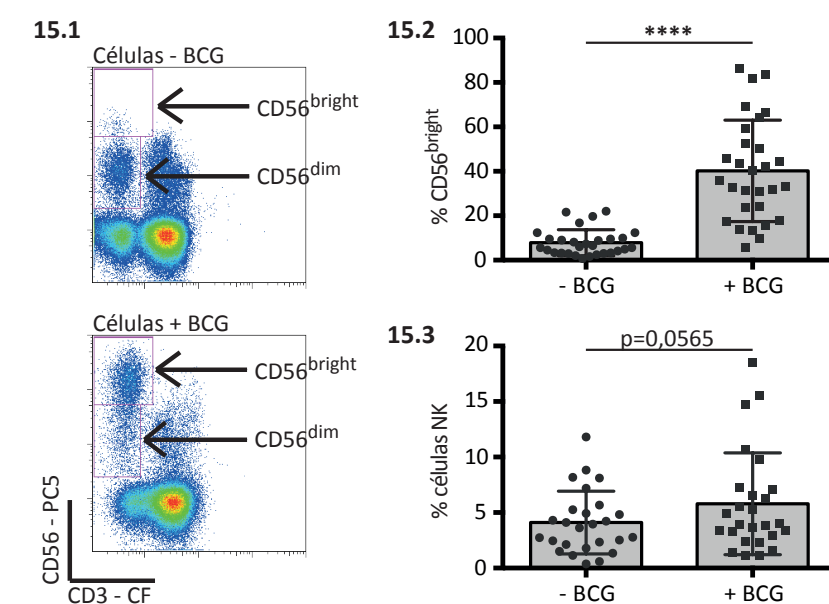
Los resultados descritos hasta ahora demuestran que las células NK, una vez activadas, son capaces de reconocer y eliminar a las células tumorales uroteliales. Sin embargo, la estimulación con BCG, tanto de las células tumorales uroteliales como de las células NK activadas con IL-2, no es capaz de promover un mejor reconocimiento de las células tumorales ni una mayor respuesta por parte de las células NK activadas. Además, la micobacteria, de manera directa, tampoco es capaz de activar a las células NK recién purificadas, por lo que estas células NK, tanto estimuladas con BCG como sin estimular, no son capaces de reconocer a las células uroteliales.

Por tanto, se decidió continuar con el estudio del fenotipo y la función de las células NK tras la estimulación con BCG de cultivos de células mononucleares de sangre periférica o PBMCs (del inglés "*Peripheral Blood Mononuclear Cells*") totales. Como ya se adelantó en la introducción, en el contexto del total de PBMCs, la estimulación con BCG *in vitro* promueve la generación de una población de células BAK (del inglés "*BCG-Activated Killer cells*") que, fenotípicamente, se caracteriza por la expresión de CD56 en su superficie y la ausencia de CD3, y que, funcionalmente, es responsable de la capacidad citotóxica observada frente a distintas líneas tumorales uroteliales (Thanhäuser et al. 1993). Sin embargo, la generación de esa población citotóxica está supeditada a la presencia de monocitos y células CD4<sup>+</sup> (Thanhäuser et al. 1995).

#### 3.1. LA ESTIMULACIÓN CON BCG DE CULTIVOS DE PBMCs TOTALES PROVOCA LA ACTIVACIÓN DE UNA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> CITOTÓXICA

En estudios previos ya se había demostrado que el tiempo óptimo de estimulación de PBMCs con BCG para conseguir una población de células BAK citotóxica era de 7 días (Thanhäuser et

al. 1993). Por ese motivo, se decidió incubar durante una semana PBMCs recién purificados, de donantes sanos, sin ningún tipo de estímulo o en presencia de BCG, con el fin de analizar el efecto que la micobacteria tenía sobre las células NK. La ratio utilizada fue 1:50 (BCG : PBMC), de tal forma que, asumiendo que las células NK son aproximadamente un 10% del total de linfocitos, esta proporción equivaldría a una ratio 1:5 (BCG : célula NK). Tras los 7 días de incubación, se recogieron las células y, por citometría de flujo, se analizaron las diferentes poblaciones de linfocitos. Como se observa en la *figura 15.1*, la estimulación con BCG de las PBMCs produjo una respuesta clara en las células NK ( $CD3^+CD56^+$ ): hubo un aumento del porcentaje que representa la subpoblación de células NK  $CD56^{bright}$ . A pesar de la variación en el grado de respuesta debida al donante, el aumento en la proporción que esta población de células NK  $CD56^{bright}$  representa en el total de células NK se ha observado de manera consistente en experimentos realizados con múltiples donantes, pasando de representar un  $7,84 (\pm 5,90)$  % en los cultivos sin estimular a representar un  $40,22 (\pm 22,83)$  % del total de células NK en los cultivos estimulados con BCG (*figura 15.2*). Además, a pesar de ser más moderada y no ser estadísticamente significativa ( $p=0,0565$ ), en casi todos los experimentos se observó una tendencia de aumento en el porcentaje que representa la población de células NK en el total de linfocitos tras el tratamiento con BCG (*figura 15.3*).



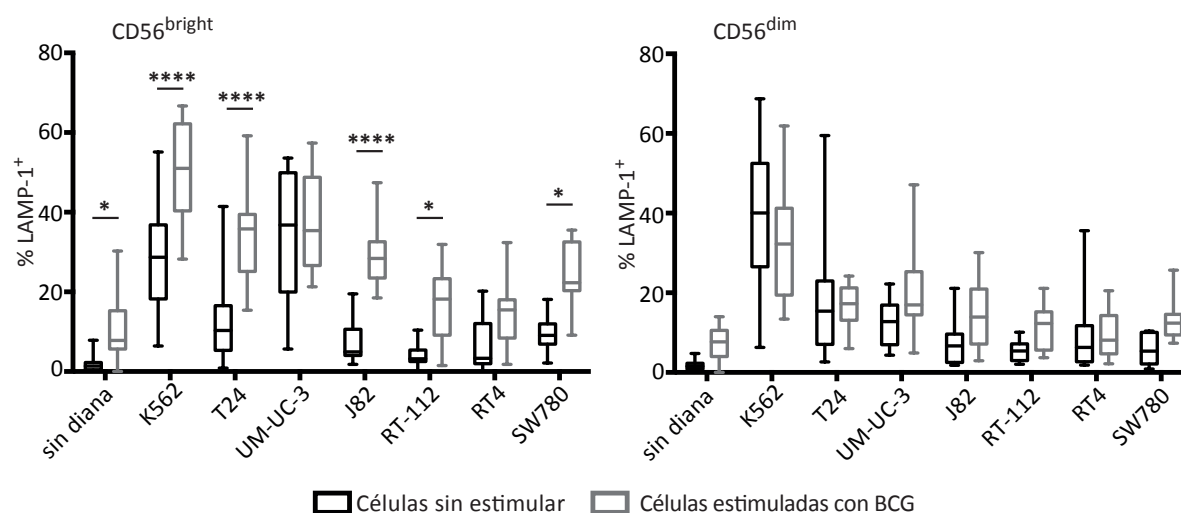
**Figura 15.** Respuesta de las células NK, en el contexto del total de PBMCs, a la estimulación con BCG durante 7 días. Se co-incubaron las PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC). Tras ese tiempo, se analizaron las poblaciones celulares por citometría de flujo. **15.1.** Gráficos de citometría de flujo representativos de las poblaciones de linfocitos a día 7 del tratamiento. Se señalan las subpoblaciones de células NK  $CD56^{bright}$  y  $CD56^{dim}$ . **15.2.** Comparación del porcentaje que representa la subpoblación  $CD56^{bright}$  dentro del total de células NK, tras la incubación de

las PBMCs durante 7 días en presencia o ausencia de BCG. (n=29). **15.3.** Comparación del porcentaje de células NK dentro del total de linfocitos tras la incubación de las PBMCs durante 7 días en presencia o ausencia de BCG. (n=26). **15.2 y 15.3.** Se representan la media y la desviación típica para cada condición, representándose con un punto el valor para cada experimento. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras relacionadas, \*\*\*\*  $p<0,0001$ .

A continuación, se estudió la capacidad citotóxica de estas células NK, expandidas tras la estimulación con BCG, para responder frente a las distintas líneas tumorales uroteliales. Para ello, tras la semana en cultivo en presencia o ausencia de BCG, se utilizaron las PBMCs en ensayos de desgranulación. Al igual que en experimentos anteriores, se co-incubaron durante 2 horas con las líneas de células tumorales de vejiga o con las células K562, pero en este caso



a una ratio 5:1 (PBMC : célula diana), que equivaldría a una ratio 1:2 (célula NK : célula diana). Transcurrido ese tiempo, se recogieron las células y se analizaron por citometría de flujo para examinar la presencia de LAMP-1 en la superficie de las células NK. Como se puede observar en la *figura 16*, la estimulación con BCG no sólo produjo un aumento en el porcentaje que la población que las células CD56<sup>bright</sup> representan en el total de las células NK (*figura 15.1* y *figura 15.2*), sino que, sorprendentemente, también produjo un aumento en su capacidad citotóxica. A pesar de que, incluso sin diana, las células NK, tanto CD56<sup>bright</sup> como CD56<sup>dim</sup>, aumentaron su desgranulación espontánea tras la estimulación con BCG, la exposición a las distintas líneas tumorales uroteliales, así como a la línea K562, provocó un incremento en la desgranulación principalmente en la subpoblación CD56<sup>bright</sup> estimulada con BCG.



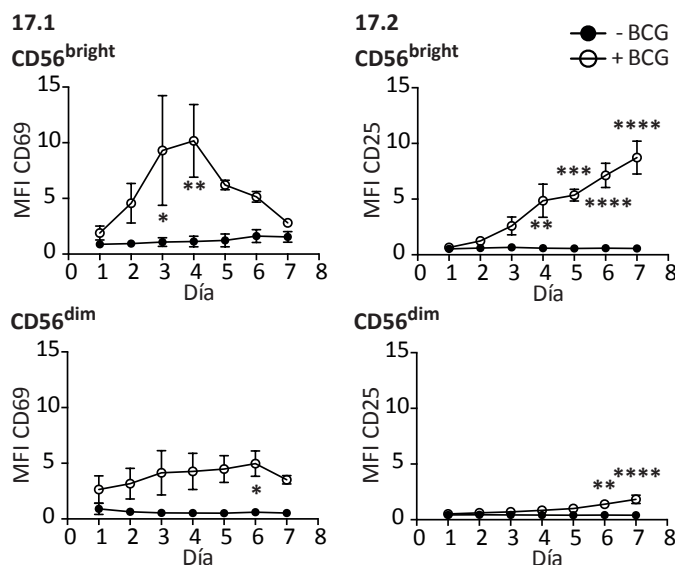
**Figura 16.** Reconocimiento de las células tumorales de vejiga por parte de células NK activadas con BCG en el contexto del total de PBMCs. Se co-incubaron las PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante 7 días. Tras ese tiempo, se utilizaron en ensayos de desgranulación, co-incubando las PBMCs a una ratio 5:1 (efectora : diana) con la línea celular K562, como control positivo, y las distintas líneas tumorales de vejiga durante 6h. Se representa el porcentaje de células NK desgranulando como el %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, analizando por separado las subpoblaciones CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. Los datos se muestran en diagramas de cajas. Para el análisis estadístico, se aplicó ANOVA de varios factores, \* p<0,05, \*\*\*\* p<0,0001. (n≥9).

Al igual que ocurriría con las células tumorales, es muy difícil predecir la ratio a la que la BCG se encontraría con las células inmunitarias que infiltran la vejiga. Por ese motivo, se realizaron titulaciones con distintos ratios BCG : PBMC, y se vio que desde la ratio 1:5 hasta la ratio 1:100 se obtenían expansiones similares por parte de las células CD56<sup>bright</sup> (datos no mostrados), teniendo en cuenta la variabilidad que existe entre donantes. De tal forma que se decidió seguir utilizando la ratio 1:50 en todos los ensayos.

Posteriormente, se analizó el estadio de activación de las células NK mediante la cuantificación en superficie de la expresión de las moléculas CD69, que es un marcador de activación temprano (Werfel et al. 1997), y CD25, que es un marcador de activación más tardío que CD69 (Reddy et al. 2004). Para ello, se pusieron PBMCs en cultivo en presencia y ausencia de BCG durante 1 semana, y se analizó por citometría de flujo la expresión de CD69 y CD25



diariamente. Como se puede observar en la *figura 17.1*, la expresión de CD69 fue siempre superior en las células NK estimuladas con BCG que en las células sin estimular, alcanzándose un pico de expresión máximo en los días 3 y 4 del co-cultivo en las células NK CD56<sup>bright</sup>. Por su parte, la expresión de CD25 fue más moderada en los primeros días del co-cultivo (*figura 17.2*), empezando a aumentar en la subpoblación CD56<sup>bright</sup> a partir del día 3, y a partir del día 7 en la subpoblación CD56<sup>dim</sup>. Esto demuestra que la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> se activa en mayor grado y de manera más temprana que la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> en respuesta a la estimulación con la micobacteria.



**Figura 17.** Expresión de marcadores de activación en las células NK tras la estimulación con BCG. Se co-incubaron las PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante 7 días. Diariamente, se analizó la expresión de CD69 (17.1) y CD25 (17.2) en las distintas subpoblaciones de células NK. Se representan la intensidad de fluorescencia media (MFI) y la SEM de cada molécula para cada día. Para el análisis estadístico, se aplicó ANOVA de varios factores, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (n=3).

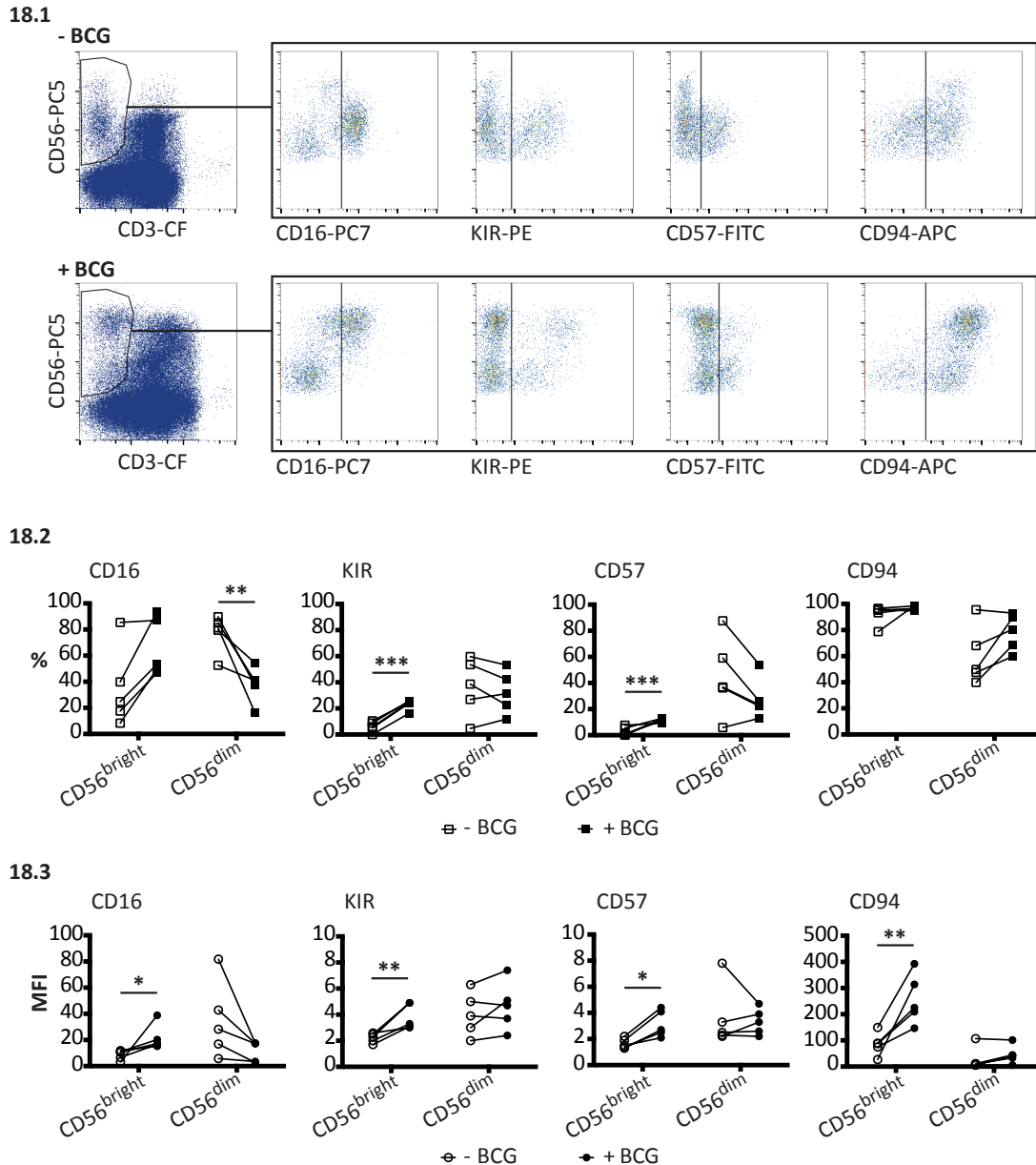
Estos datos indican que la estimulación con BCG, en el contexto del total de células mononucleares de sangre periférica, favorece la generación de una población de células NK CD56<sup>bright</sup> activada que empieza a ganar importancia no sólo en el subconjunto de células NK sino también en el cultivo de PBMCs y que, además, es capaz de reconocer mejor a las células tumorales uroteliales y responder frente a ellas mediante la liberación de sus gránulos líticos.

### 3.2. LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> CITOTÓXICA SE CARACTERIZA POR LA EXPRESIÓN DE CD16, KIR, CD94 Y CD57

Clásicamente, se ha aceptado que la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> es, principalmente, productora de citoquinas (Cooper 2001), presenta una baja citotoxicidad y se encuentra en un estadio de diferenciación anterior al de la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup>, que sería la subpoblación de células NK citotóxica (Yu et al. 2013). Sin embargo, en este sistema, las células NK CD56<sup>bright</sup> que se generan en respuesta a la micobacteria, tienen una alta capacidad citotóxica frente a las líneas tumorales de vejiga (*figura 16*).

Se ha descrito que, en sangre periférica, las dos subpoblaciones de células NK expresan distintas moléculas en su superficie, siendo las células NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> CD57<sup>-</sup> CD94<sup>+</sup>, y las

células NK  $CD56^{dim} CD16^{+/-} KIR^{+/-} CD57^{+/-} CD94^{+/-}$  (Cooper et al. 2001). Con el fin de caracterizar la expresión de estas moléculas en las dos subpoblaciones de células NK tras ser estimuladas con BCG, se incubaron PBMCs en presencia o ausencia de BCG durante 7 días y, tras ese tiempo, se analizaron por citometría de flujo las diferentes moléculas ya citadas. A diferencia de lo que ocurrió con las células del cultivo sin estimular, las cuales mantuvieron la expresión de estas moléculas igual que las células NK de sangre periférica, tras la activación mediada por BCG,



**Figura 18.** Efecto de BCG en la expresión de varios receptores por parte de las dos subpoblaciones de células NK. Se co-incubaron las PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante 7 días. Tras ese tiempo, se analizó la expresión de los receptores CD16, KIR, CD57 y CD94 en las dos subpoblaciones de células NK. **18.1.** Gráficos de citometría de flujo representativos de los niveles de expresión de los distintos receptores en las dos subpoblaciones de células NK a día 7 del cultivo. **18.2.** Porcentaje de células que expresan los diferentes receptores en las dos subpoblaciones de células NK tras haber sido incubadas en presencia o ausencia de BCG. **18.3.** Intensidad media de fluorescencia (MFI) de los diferentes receptores, en las células positivas para dichos receptores, en las dos subpoblaciones de células NK tras haber sido incubadas en presencia o ausencia de BCG. **18.2 y 18.3.** Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras relacionadas, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . (n=5).

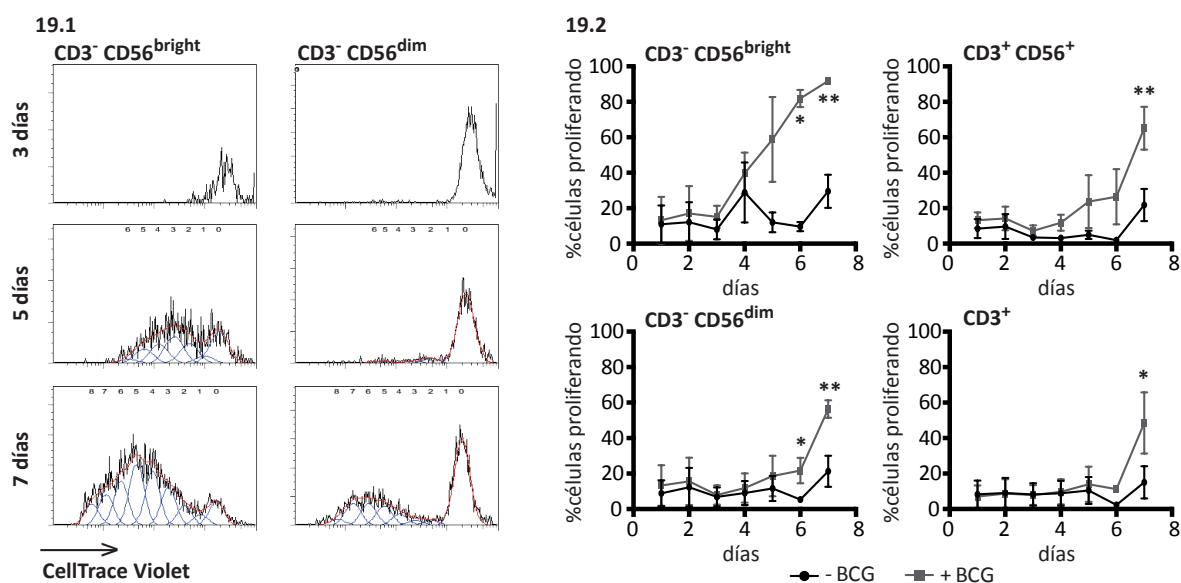
una parte de las células NK CD56<sup>bright</sup> comenzaron a expresar en su superficie CD16, KIR y CD57 y aumentaron el nivel de expresión de CD94 (figura 18.1). Este aumento se produjo, no sólo en el porcentaje de células que expresa cada molécula (figura 18.2), sino también en la intensidad de fluorescencia de estas moléculas, es decir, en la cantidad de moléculas que expresa cada célula (figura 18.3), para las cuatro moléculas estudiadas. En cambio, en la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup>, probablemente el cambio más llamativo fue la pérdida de expresión de CD16 (figura 18).

Estos datos indican que, tras la estimulación con BCG, estas células NK CD56<sup>bright</sup>, activadas por acción de la micobacteria, presentan en su superficie moléculas propias de las células NK CD56<sup>dim</sup> así como la capacidad citotóxica de esta subpoblación.

### 3.3. LA ESTIMULACIÓN CON BCG PROVOCA LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> CITOTÓXICAS Y LA MUERTE DE LAS CÉLULAS NK CD56<sup>DIM</sup>

El ligero aumento en el porcentaje de células NK en el cultivo de PBMCs tras la estimulación con BCG, acompañado del importante aumento en el porcentaje que las células NK CD56<sup>bright</sup> representan en el total de células NK, pone de manifiesto que estas células están ganando importancia en el cultivo. Con el fin de estudiar las posibles causas que favorecen la expansión de esta nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup>, se estudió la proliferación y la muerte de las principales poblaciones linfocitarias del cultivo a consecuencia de la estimulación con BCG.

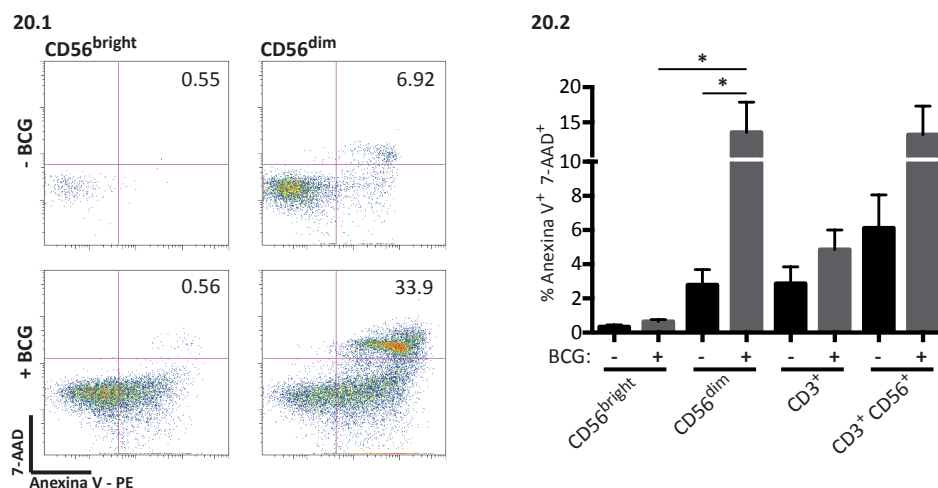
| 93



**Figura 19.** Efecto de BCG en la proliferación de las distintas poblaciones celulares del cultivo. Se incubaron PBMCs de donantes sanos, marcados con *CellTrace Violet stain*, en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante 7 días. Diariamente, se analizó la proliferación de las distintas poblaciones del cultivo. **19.1.** Histogramas de citometría de flujo representativos para el marcador de proliferación de las dos subpoblaciones de células NK tras ser incubados con BCG durante los días indicados. **19.2.** Porcentaje de células de cada población que están proliferando a lo largo de la semana en cultivo, en presencia o ausencia de BCG. Se representan la media y la SEM para cada día. Para el análisis estadístico, se aplicó ANOVA de varios factores, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . (n=4).

Para estudiar la proliferación en respuesta a la micobacteria, se marcaron las PBMCs con el marcador de proliferación CellTrace Violet™ y se incubaron en presencia y ausencia de BCG durante 7 días. Diariamente, se analizó por citometría de flujo la proliferación de las distintas poblaciones celulares del co-cultivo. Como se puede observar en la *figura 19*, la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> fue la primera que empezó a proliferar en respuesta a BCG. De hecho, a partir del día 5 de co-cultivo, ya se observó un nivel de proliferación considerable, mientras que la otra subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup>, así como los linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> o las células CD3<sup>+</sup>, no mostraron diferencias significativas con las células control hasta el día 7 de co-cultivo con la micobacteria (*figura 19.2*). Por tanto, el hecho de que estas células NK CD56<sup>bright</sup> respondan y empiecen a proliferar antes que el resto está favoreciendo el hecho de que ganen importancia al final del co-cultivo.

Otros factores, como la muerte celular, también pueden favorecer que distintas poblaciones ganen o pierdan importancia dentro de un cultivo. Con el fin de comprobar cómo estaba afectando la presencia de BCG a las distintas poblaciones celulares, se incubaron PBMCs en presencia o ausencia de BCG y se estudió la muerte celular por citometría de flujo, marcando las células con Anexina V y 7-AAD, a distintos tiempos (datos no mostrados) en las distintas subpoblaciones del cultivo. En la *figura 20* se muestra el porcentaje de células muertas o que se encuentran en una etapa apoptótica tardía (determinado como porcentaje de Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) en las distintas poblaciones celulares de los cultivos. Tras 7 días en cultivo con BCG, el porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup> que estaban en una etapa apoptótica tardía aumentó, mientras que apenas hubo cambios debido a la micobacteria en el porcentaje de células



**Figura 20.** Efecto de BCG en la muerte celular de las distintas poblaciones celulares del cultivo. Se incubaron PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante 7 días. Tras ese tiempo, se analizó la muerte de las distintas poblaciones celulares del cultivo como porcentaje de células en fase apoptótica tardía (%anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>). **20.1.** Gráficos de citometría de flujo representativos del %anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup> en las dos subpoblaciones de células NK tras ser incubadas con BCG durante 7 días. **20.2.** Porcentaje de cada población celular que está en fase apoptótica tardía tras 7 días en presencia o ausencia de BCG. Se representan la media y la SEM para cada condición. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras relacionadas, \* p<0,05, \*\* p<0,01. (n=8).

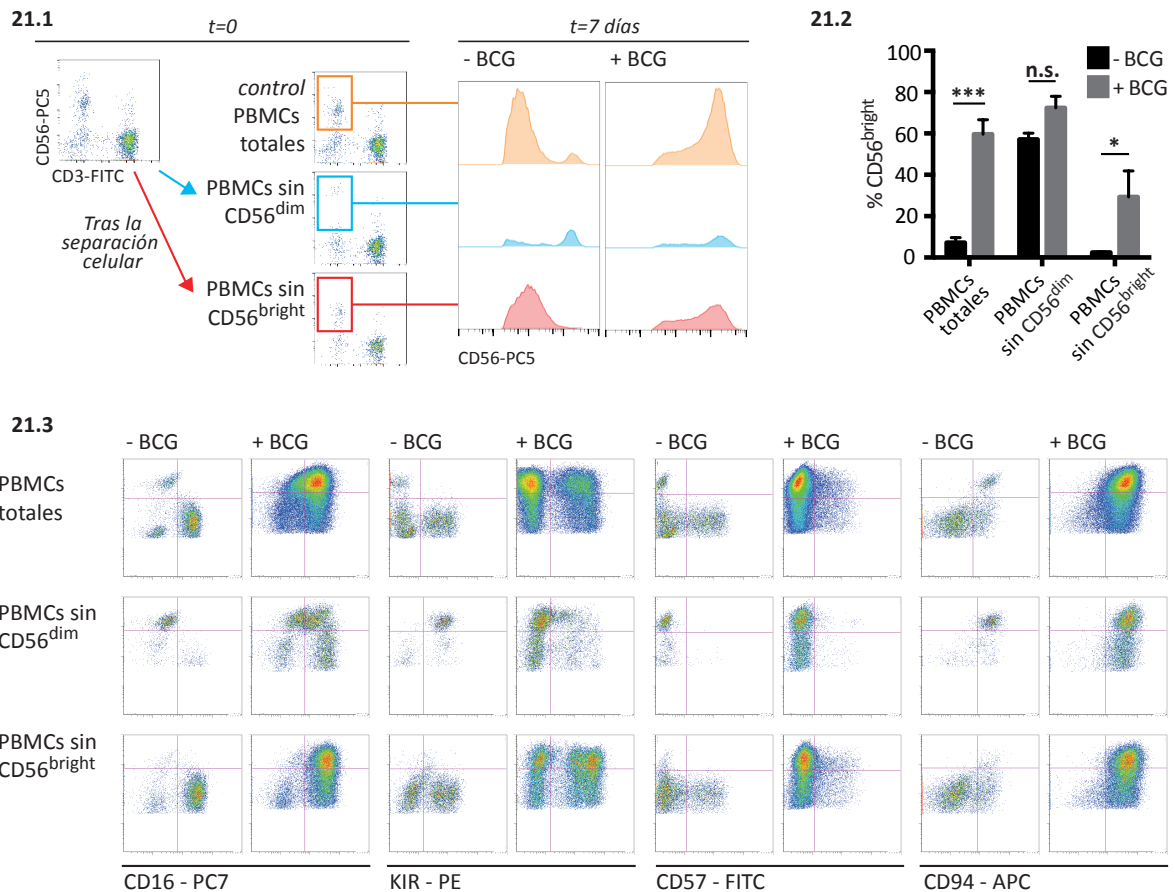
NK CD56<sup>bright</sup>. En cuanto a las otras poblaciones celulares estudiadas (*figura 20.2*), hay cierta tendencia de aumento en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> apoptóticas tras la incubación con BCG, a pesar de no ser estadísticamente significativa, mientras que en las células CD3<sup>+</sup> este efecto es menos evidente.

En conjunto, estos datos demuestran que el motivo por el que las células NK CD56<sup>bright</sup> ganan importancia en el cultivo es porque no sólo proliferan más, sino que también se mueren menos en comparación con las células NK CD56<sup>dim</sup> y con el resto de poblaciones linfocitarias del cultivo.

### 3.4. LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> CITOTÓXICA SE GENERA, PRINCIPALMENTE, A PARTIR DE CÉLULAS NK CD56<sup>DIM</sup>

Para averiguar el origen de esta población citotóxica de células NK CD56<sup>bright</sup>, se separaron, utilizando un citómetro de flujo separador, por un lado las células NK CD56<sup>dim</sup>, dejando el cultivo de PBMCs sólo con células NK CD56<sup>bright</sup>, y por otro las células NK CD56<sup>bright</sup>, dejando el cultivo de PBMCs sólo con células NK CD56<sup>dim</sup>. A continuación, estos PBMCs con sólo una de las dos subpoblaciones de células NK, así como las PBMCs control, se pusieron en cultivo en presencia o ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMCs), durante 7 días. A distintos puntos de tiempo (datos no mostrados), se recogieron y analizaron las células para comprobar si la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> se podía originar.

En la *figura 21.1*, se muestra el aumento en la intensidad de fluorescencia media de CD56 en las células NK de las PBMCs de un donante tras 7 días de estimulación con BCG. Se ha utilizado este donante en la figura porque, a pesar de que esta respuesta no ha sido tan exacerbada en el resto de donantes, aún siguiendo la misma tendencia, este ejemplo ilustra mejor qué es lo que está ocurriendo con los distintos receptores que ya se habían estudiado (*figura 18*). En el cultivo de PBMCs que sólo contenía la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup>, se observó un aumento en el nivel de expresión de CD56 en esta subpoblación tras la exposición a la micobacteria, de tal forma que un alto porcentaje de ella pasó a ser CD56<sup>bright</sup>. Como se observa en la *figura 21.2*, tras el análisis de varios donantes, se produjo un aumento significativo en el porcentaje que representa la subpoblación CD56<sup>bright</sup> en el total de células NK, tanto en los cultivos de PBMCs totales, como ya habíamos visto (*figura 15.2*), como en aquellos a los que les faltaba la subpoblación CD56<sup>bright</sup>. Además, en los cultivos en los que se había eliminado la subpoblación CD56<sup>dim</sup>, dado que la purificación no fue del 100%, se puede apreciar un ligero aumento en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> tras la estimulación con BCG, a pesar de no ser éste estadísticamente significativo (*figura 21.2*). Además, esta población CD56<sup>bright</sup>, que originalmente ya era CD56<sup>bright</sup>, empieza a expresar CD16 y KIR, aunque con poca intensidad, a la vez que aumenta la intensidad de fluorescencia media de CD94 (*figura 21.3*). Por su parte,



**Figura 21.** Efecto de BCG en las dos subpoblaciones de células NK, CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. Se incubaron, en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante 7 días, PBMCs de donantes sanos en los que se había separado, previamente, una de las subpoblaciones de células NK con un citómetro de flujo separador. **21.1.** A la izquierda, gráficos de citometría de flujo representativos de las poblaciones de linfocitos según su expresión de CD3 y de CD56 tras haberse eliminado una de las dos subpoblaciones de células NK (según se indica en la figura) a tiempo 0. A la derecha, en histogramas de citometría se representa también la intensidad media de fluorescencia de CD56 en la población total de las células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) tras 7 días en cultivo en presencia de BCG. **21.2.** Comparación del porcentaje de células NK que representa la subpoblación CD56<sup>bright</sup> tras la incubación de las PBMCs durante 7 días en presencia o ausencia de BCG, después de haberse separado una de las subpoblaciones de células NK. Para el análisis estadístico se aplica ANOVA de varios factores, \* p<0,05, \*\*\* p<0,001, n.s. no significativo. (n=3) **21.3.** Gráficos de citometría de flujo representativos de los niveles de expresión de los distintos receptores en las dos subpoblaciones de células NK de los diferentes cultivos del mismo donante de 21.1 tras la separación de una de las subpoblaciones. **21.1** y **21.3.** Se muestran los datos de un donante en el que se produjo una gran expansión de la subpoblación CD56<sup>bright</sup>.

en el cultivo del que se había eliminado la subpoblación CD56<sup>bright</sup>, el aumento en la intensidad de fluorescencia de CD56 de la subpoblación CD56<sup>dim</sup> fue acompañado del mantenimiento en la expresión de CD16, KIR y CD57, así como el aumento en la expresión de CD94 (figura 21.3).

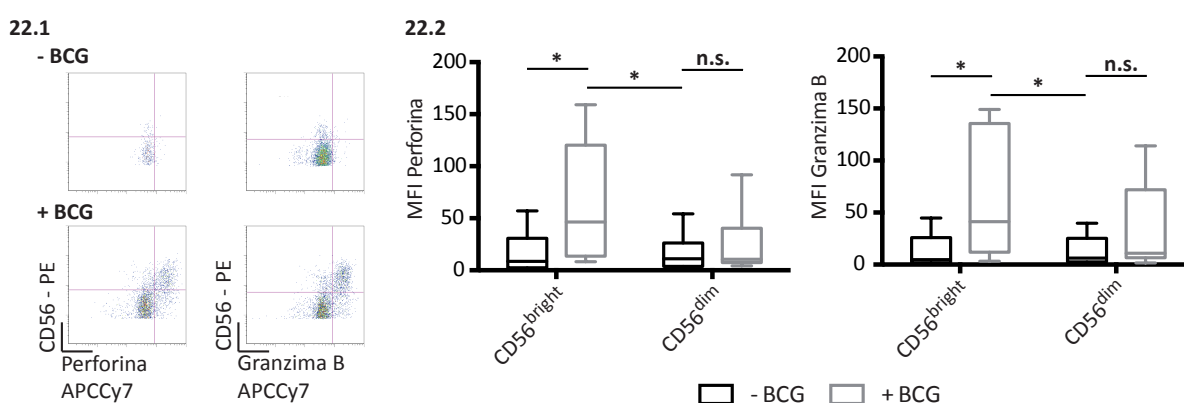
Estos datos demuestran que la población de células NK CD56<sup>bright</sup> citotóxica, generada en respuesta a la BCG, procede, principalmente, de células NK CD56<sup>dim</sup>, aunque la subpoblación CD56<sup>bright</sup> también contribuye en cierta medida. Esto explicaría el hecho de que la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> muestre características típicas de la subpoblación CD56<sup>dim</sup>, tanto fenotípicas como funcionales.



### 3.5. LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> CITOTÓXICA AUMENTA EL CONTENIDO DE PERFORINA Y GRANZIMA B EN SUS GRÁNULOS LÍTICOS

Se caracterizaron las propiedades citotóxicas de estas células CD56<sup>bright</sup> que, una vez estimuladas con BCG, reconocen y son capaces de desgranular frente a las células tumorales uroteliales (*figura 16*). Datos previos de la literatura indican que las células BAK, generadas tras la estimulación de PBMCs con BCG durante una semana, aumentaban su contenido en perforina (Brandau and Böhle 2001). Posteriormente se describió que, a tiempos más cortos de estimulación con BCG, y ya diferenciando las dos subpoblaciones de células NK, la cantidad de perforina disminuía en las células NK CD56<sup>dim</sup>, mientras que la cantidad de granzima A se mantenía estable en ambas subpoblaciones (Batoni et al. 2005). Para analizar lo que ocurría en nuestro sistema, se analizaron los niveles de perforina y granzima B basales (datos no mostrados) y tras 7 días en cultivo, en presencia o ausencia de BCG, por citometría de flujo intracelular. Como se puede observar en la *figura 22*, tras 7 días en cultivo, los niveles de expresión de perforina y granzima B son relativamente bajos en ambas subpoblaciones de células NK de los cultivos en los que las PBMCs fueron incubadas en ausencia de estímulo. Sin embargo, ambas subpoblaciones de células NK de los cultivos de PBMCs estimulados con BCG muestran niveles más elevados tanto de perforina como de granzima B. En estas condiciones, los niveles de ambas moléculas en la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> fueron muy parecidos a los observados al inicio del cultivo (datos no mostrados), manteniéndose ligeramente elevados si se compara con los niveles de esas mismas moléculas en la misma subpoblación del cultivo sin estimular. Sin embargo, es llamativo que la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> muestre niveles de expresión de estas moléculas más elevados que la propia subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> en las mismas condiciones, aún sabiendo que gran parte de esta población procede de la población de células NK CD56<sup>dim</sup> inicial. Además, esta

| 97



**Figura 22.** Efecto de BCG en el contenido en perforina y granzima B de las células NK tras la estimulación de PBMCs con BCG durante 7 días. **22.1.** Gráficos de citometría de flujo representativos de la cantidad de perforina y granzima B en las células NK tras una semana en cultivo en presencia o ausencia de BCG. Según el nivel de expresión de CD56, se pueden distinguir las dos subpoblaciones de células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. **22.2.** Intensidad de fluorescencia media (MFI) de perforina y granzima B en las subpoblaciones de células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> tras una semana en cultivo en presencia y ausencia de BCG. Los datos se representan en diagramas de cajas. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras relacionadas, \* p<0,05. (n=8).

diferencia es estadísticamente significativa cuando se compara con ambas subpoblaciones de células NK del cultivo sin estimular (*figura 22.2*). Por su parte, la población de células T CD3<sup>+</sup> tenía niveles muy bajos tanto de granzima como de perforina y éstos no se vieron alterados por la exposición a BCG (datos no mostrados).

En vista de estos resultados, se puede decir que, tras la estimulación de las PBMCs con BCG, se genera una población de células NK CD56<sup>bright</sup> que tiene un mayor nivel de granzimas y perforinas, lo que concuerda perfectamente con la mayor capacidad para desgranular que tienen estas células en respuesta a las células tumorales uroteliales. Además, todo esto está en consonancia con el hecho de que esta nueva subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> proceda, principalmente, de células NK CD56<sup>dim</sup>.

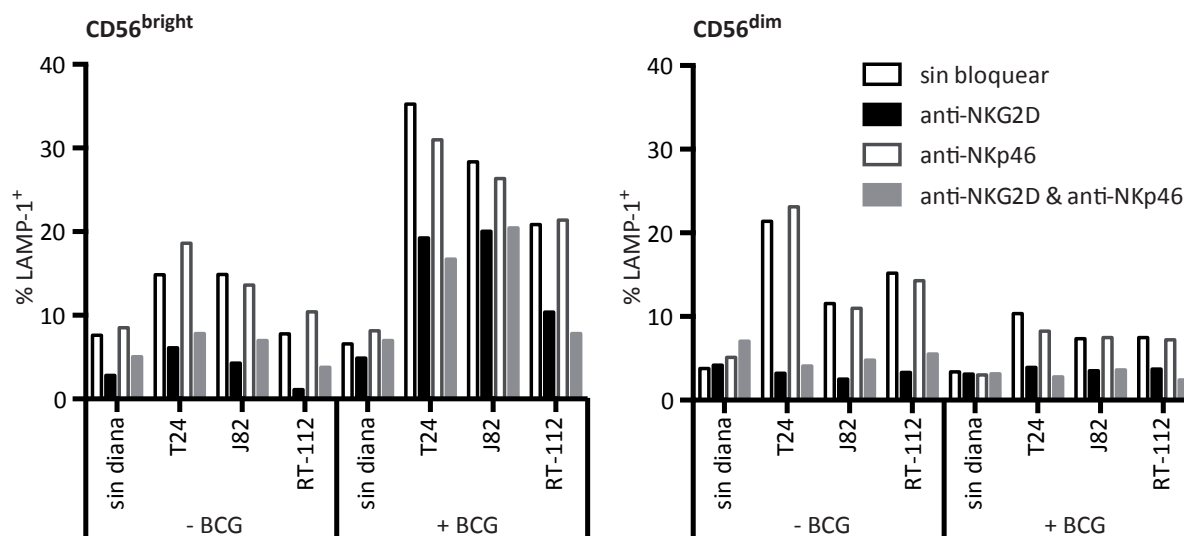
### 3.6. LA CITOTOXICIDAD DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> ESTÁ MEDIADA, EN PARTE, POR NKG2D

En la primera parte de los resultados expuestos en este trabajo se describió la importancia de los receptores activadores NKG2D y, en menor medida, NKp46 en el reconocimiento de las células tumorales uroteliales por parte de las células NK activadas con IL-2 (*figura 9.1*). Debido a esto, se decidió estudiar si había cambios en los niveles de expresión de estos receptores en las células NK tras haber sido estimuladas con BCG. Para ello, tras la semana de cultivo en presencia o ausencia de BCG, se analizaron las intensidades de fluorescencia de ambos receptores por citometría de flujo. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de estos receptores entre las dos subpoblaciones de células NK tras haber sido estimuladas o no con BCG (datos no mostrados).

En paralelo, se estudió también la contribución de estos receptores activadores al reconocimiento de las células tumorales uroteliales por parte de las células NK activadas con BCG en el contexto del total de PBMCs. Para ello, tras la semana de estimulación con BCG, se recogieron las células y se bloquearon los receptores activadores con anticuerpos monoclonales específicos para NKG2D y NKp46. Una vez bloqueados, se realizaron ensayos de desgranulación, co-incubando las células tumorales de vejiga con las PBMCs que habían sido estimuladas o no con BCG, y bloqueadas o sin bloquear con los distintos anticuerpos, a una ratio 5:1 (PBMC : célula diana) durante 2h. Transcurrido ese tiempo, se analizó la presencia de LAMP-1 en la superficie de las células NK por citometría de flujo. Como se observa en la *figura 23*, al igual que ocurría con las células NK activadas con IL-2, ambas subpoblaciones de células NK, procedentes del cultivo sin estimular con BCG, perdían casi por completo la capacidad de reconocer a las células tumorales uroteliales cuando tenían NKG2D bloqueado, mientras que NKp46 no fue tan importante en estas condiciones. Sin embargo, en las células NK que procedían del cultivo estimulado con BCG, el bloqueo de NKG2D produjo una reducción parcial en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> que desgranulaban, siendo casi total en la



subpoblación CD56<sup>dim</sup>. De nuevo, en estas condiciones, el receptor Nkp46 no desempeñó un papel tan importante como en el caso de las células NK activadas con IL-2.



**Figura 23.** Papel de los receptores activadores NKG2D y Nkp46 en el reconocimiento de las células tumorales de vejiga por las células NK tras haber sido estimuladas, en el contexto del total de PBMCs, en presencia o ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC) durante 7d. Tras ese tiempo, se bloquearon los receptores NKG2D y Nkp46 en las PBMCs y se co-incubaron a una ratio 5:1 (PBMC : diana) junto con las células tumorales de vejiga durante 2h. Se representa el porcentaje de células NK que está desgranulando como %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, analizando por separado las subpoblaciones CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. Se muestra un ejemplo representativo. (n=3).

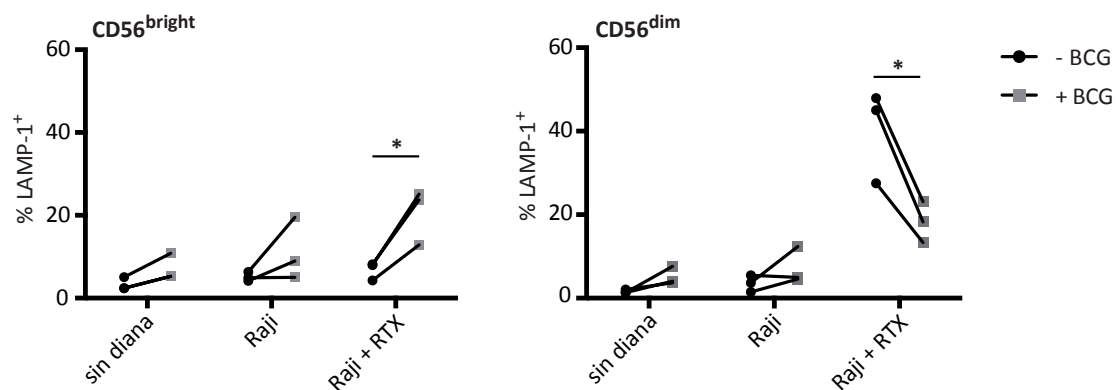
Estos datos sugieren que, en la nueva subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> que se genera tras la estimulación del total de PBMCs con BCG, el aumento de la citotoxicidad en respuesta a las células tumorales uroteliales está mediado, no sólo por el receptor NKG2D, como ocurría con las células activadas con IL-2, sino también por otros receptores que parece que pueden estar desempeñando un papel muy importante, aunque no han sido objeto de este estudio.

### 3.7. LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> CITOTÓXICA AUMENTA SU CAPACIDAD PARA MEDIAR ADCC

Como ya se adelantó en la introducción, además de la citotoxicidad natural mediada por el reconocimiento de moléculas que la célula diana expresa en su superficie, las células NK también pueden reconocer y responder frente a células que tengan unidas IgG por medio del mecanismo denominado ADCC. Este reconocimiento está mediado por la molécula CD16, que es un receptor de baja afinidad para la porción Fc de las IgG. Como se ha visto anteriormente, tras la estimulación de las PBMCs con BCG, la expresión clásica de esta molécula, restringida a la subpoblación CD56<sup>dim</sup>, se ve afectada, de tal forma que la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> la expresan mientras que las células CD56<sup>dim</sup> disminuyen su expresión (*figura 18*). Con el fin de estudiar si la estimulación con BCG afectaba también a la capacidad de estas células para mediar ADCC, tras la semana de incubación en presencia y ausencia de BCG, se utilizaron

las PBMCs para realizar ensayos de desgranulación frente a células Raji que, previamente, habían sido incubadas o no con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 Rituximab (RTX). El ensayo se hizo a una ratio 5:1 (PBMC : célula diana) durante 2 horas y, tras ese tiempo, se analizó por citometría de flujo la presencia de LAMP-1 en la superficie de las células NK. Las líneas de células Raji es una línea tumoral de linfocitos B que no tiene moléculas activadoras para las células NK. Por tanto, cabe esperar que, sólo cuando estas células han sido pre-tratadas con RTX, las células NK serán capaces de desgranular frente a ellas por ADCC.

Como se observa en la *figura 24*, tras la estimulación con BCG, se produjo un aumento en la desgranulación de las células NK CD56<sup>bright</sup> frente a las células Raji bloqueadas con RTX, mientras que en la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> se produjo un descenso en la desgranulación frente a estas mismas células. Estos datos concuerdan con el aumento de los niveles de expresión de CD16 en las células NK CD56<sup>bright</sup>, y el descenso de los niveles de expresión de esa misma molécula en las células NK CD56<sup>dim</sup> tras la estimulación con BCG.

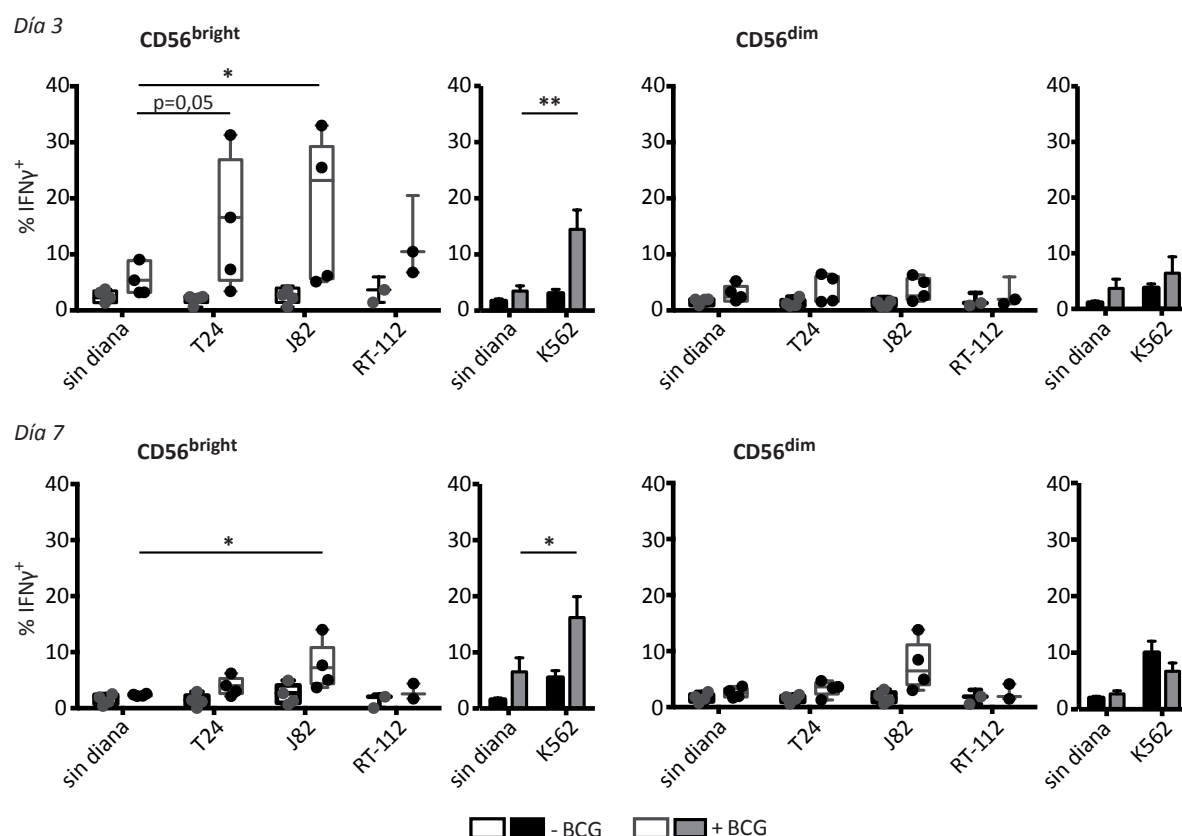


**Figura 24.** Efecto de BCG en la capacidad de las células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> para mediar ADCC. Se co-incubaron PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante una semana. Tras ese tiempo, las células se utilizaron en ensayos de ADCC, co-incubando las PBMCs a una ratio 5:1 (efectora : diana) con la línea celular Raji, pre-incubada o no con RTX, durante 2h. Se representa el porcentaje de células NK desgranulando como el %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, analizando por separado las subpoblaciones CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras relacionadas, \* p<0,05. (n=3).

### 3.8. LA ESTIMULACIÓN CON BCG PRODUCE UN AUMENTO EN LA CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE IFN $\gamma$ EN LAS CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> A DÍA 3, QUE SE PIERDE A DÍA 7

Como ya se ha mencionado anteriormente, las células NK CD56<sup>bright</sup> son células capaces de producir citoquinas de manera más eficiente que las células NK CD56<sup>dim</sup> (Cooper et al. 2001). Además, en el apartado 1 de este trabajo, se había visto cómo las células NK, una vez activadas con IL-2, fueron capaces de reconocer y producir IFN $\gamma$  en respuesta a las células tumorales uroteliales (*figura 7.3*). Con el fin de estudiar en más detalle las funciones de la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> que se genera tras la estimulación del total de PBMCs

con BCG, se decidió estudiar si también se producían cambios en la capacidad de estas células para producir IFN $\gamma$ . Para ello, una vez más, se incubaron PBMCs en presencia o ausencia de BCG durante una semana. Tras ese tiempo, se estudió por citometría de flujo intracelular la cantidad de IFN $\gamma$  que las células NK producían en respuesta a las células tumorales uroteliales, tras haber sido co-incubadas a una ratio 5:1 (PBMC : célula diana) durante 6 h en presencia de monensina. Como se observa en la *figura 25*, tras 7 días en co-cultivo con BCG, las células NK, tanto CD56<sup>bright</sup> como CD56<sup>dim</sup>, no fueron capaces de producir grandes cantidades de IFN $\gamma$  en respuesta a las células tumorales uroteliales estudiadas. Sin embargo, a tiempos más cortos de co-cultivo, sí se detectaron diferencias considerables. Tras 3 días de estimulación con BCG, cuando las células NK aún no habían empezado a proliferar en respuesta a la micobacteria, la subpoblación CD56<sup>bright</sup> alcanzó un estadio de activación suficiente (*figura 17.1*) como para que un alto porcentaje de ellas fueran capaces de producir IFN $\gamma$  en respuesta a las células tumorales de vejiga, mientras que no lo hicieron aquellas células NK de los cultivos sin estimular (*figura 25*). Como línea control, se utilizaron las células K562, las cuales estimularon la producción



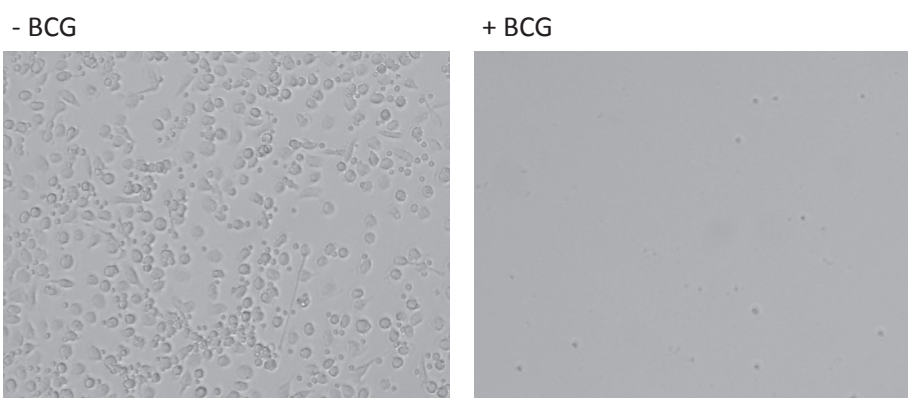
**Figura 25.** Efecto de BCG en la capacidad de las células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> para producir IFN $\gamma$ . Se co-incubaron PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC) y, tras 3 y 7 días, se recogieron las células y se utilizaron en ensayos de producción de IFN $\gamma$ . Para ello, se co-incubaron las PBMCs a una ratio 1:2 (efectora : diana) con las distintas líneas tumorales de vejiga, así como con la línea control K562, durante 6h. Se representa el porcentaje de células que producen IFN $\gamma$  (%IFN $\gamma$ <sup>+</sup>) dentro de la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, analizando por separado las subpoblaciones CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>. Los datos se muestran en diagramas de cajas cuando las células diana son células tumorales de vejiga (n=5, excepto en el caso de RT-112 donde n=3), y en diagramas de barras, donde se representan la media y la SEM, cuando las células diana son las células K562 (n≥8). Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras emparejadas, \* p<0,05, \*\* p<0,01.

de IFN $\gamma$  por parte de la subpoblación CD56<sup>bright</sup> tanto a día 3 como a día 7 de estimulación con BCG.

Estos datos sugieren que distintos receptores activadores participan en el reconocimiento de las células tumorales uroteliales y de las células K562 induciendo la producción de IFN $\gamma$ . Por otra parte, la respuesta frente a las células tumorales uroteliales sigue un patrón temporal según el cual, a tiempos cortos se produce un aumento en la capacidad de la subpoblación CD56<sup>bright</sup> para producir IFN $\gamma$ , mientras que a tiempos más largos, cuando la subpoblación CD56<sup>dim</sup> inicial también forma parte de la nueva subpoblación CD56<sup>bright</sup>, estas células pierden la capacidad para producir IFN $\gamma$ .

### 3.9. LOS MONOCITOS SE VEN AFECTADOS POR LA ESTIMULACIÓN CON BCG

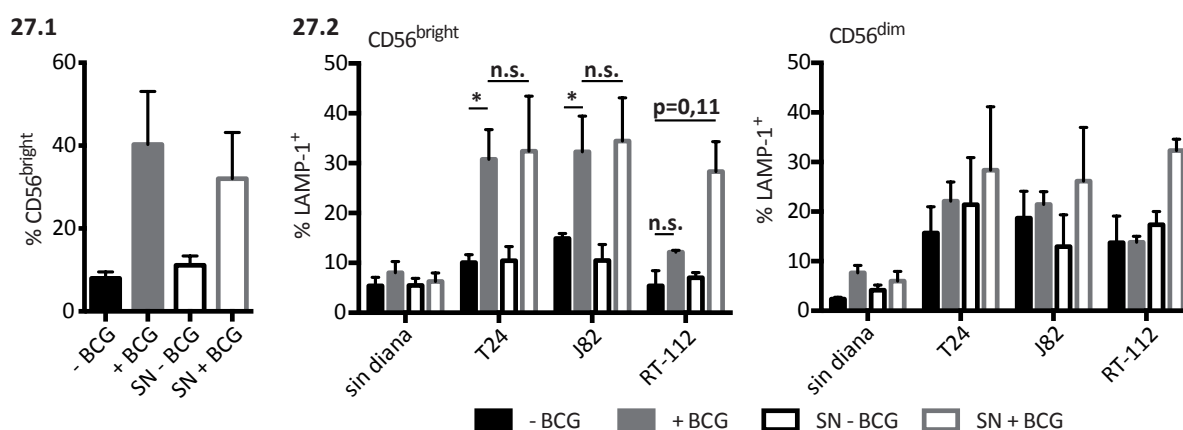
Una observación que llama la atención en los cultivos de PBMCs estimulados con BCG es que deja de haber células adheridas al pocillo tras la semana de incubación. Sin embargo, en los cultivos de PBMCs que están una semana sin estimular, estas células se mantienen (*figura 26*). Dado que la adherencia es una característica de los monocitos, este dato sugiere que estas células pueden tener un papel importante en este sistema, favoreciendo la expansión de la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup>. Pese a no ser los monocitos las principales células de estudio en este trabajo, datos del laboratorio apuntan a que, tras el tratamiento con BCG, el porcentaje de monocitos (CD14<sup>+</sup>) presente en el cultivo disminuye al tiempo que aumenta el porcentaje de estas células que están en fase apoptótica tardía (Anexina V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) (datos no mostrados). En cualquier caso, es posible que, antes de entrar en apoptosis, éstas células respondan de alguna manera a la micobacteria promoviendo así la activación de las células NK, ya sea por contacto directo o a través de factores solubles.



**Figura 26.** Efecto de BCG en la población de células adherentes de las PBMCs tras 7 días en cultivo. Se incubaron PBMCs de donantes sanos en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC) y, tras 7 días, se recogieron las células y se examinó la presencia de células adheridas al pocillo en ambas condiciones utilizando el microscopio invertido Olympus IX70. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 200x utilizando el software Cell<sup>^</sup>A (Olympus). Se muestra una imagen representativa de cada condición.

### 3.10. LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> CITOTÓXICA SE GENERA EN RESPUESTA A FACTORES SOLUBLES

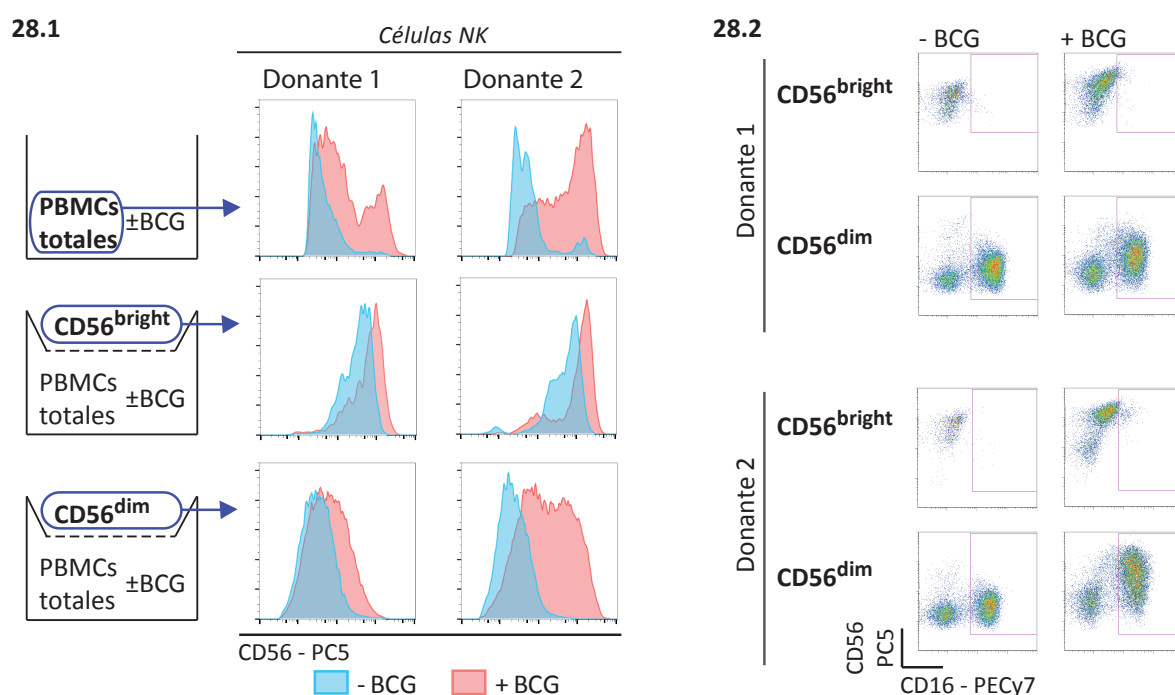
Con el propósito de comprobar si para la diferenciación de la subpoblación citotóxica de células NK CD56<sup>bright</sup> era necesario el contacto directo con otros tipos celulares que hubieran sido previamente activados por la micobacteria, o si solamente eran necesarios los factores solubles liberados tras esa activación, se decidió utilizar sobrenadantes de PBMCs que previamente habían sido estimulados o no con BCG. Así, se incubaron PBMCs en presencia o ausencia de BCG, y en medio condicionado procedente de otros PBMCs que habían estado en cultivo durante una semana en presencia o ausencia de BCG. En ambos casos, se diluyeron los medios condicionados 1:2 en medio fresco para reponer los nutrientes que se podrían haber agotado tras la primera semana de uso, y en el caso del medio procedente del cultivo estimulado con BCG, se eliminó la bacteria por centrifugación. Tras la semana de incubación, se analizó la población de células NK resultante y se realizaron ensayos de desgranulación frente a las células tumorales uroteliales. Como se observa en la *figura 27*, tanto la incubación con BCG como la incubación con el medio condicionado del cultivo tratado con BCG provocaron el aumento del porcentaje que la población CD56<sup>bright</sup> representa en el total de células NK (*figura 27.1*). Además, estas poblaciones de células NK CD56<sup>bright</sup> expandidas también aumentaron su capacidad para responder frente a las células tumorales uroteliales en ambas condiciones (*figura 27.2*). Sin embargo, la incubación con medio condicionado del cultivo sin estimular, no produjo cambios en la población CD56<sup>bright</sup> resultante, ni tampoco en su respuesta frente a las células tumorales uroteliales, siendo ésta muy parecida a la de las células que se incubaron en medio fresco sin ningún tipo de estímulo. En cuanto a la subpoblación CD56<sup>dim</sup>, pese a que no hubo apenas efecto en su capacidad citotóxica debido a la incubación con la micobacteria, sí que parece haber una ligera tendencia de aumento de la desgranulación en respuesta a



**Figura 27.** Efecto de los factores solubles liberados en los cultivos estimulados y sin estimular con BCG en la expansión y la capacidad de desgranulación de las células NK tras 7 días en cultivo. Se incubaron PBMCs en presencia y ausencia de BCG (–/+ BCG), así como con la adición de medios condicionados, procedentes de cultivos previos de PBMCs estimulados o sin estimular con BCG, durante 7 días, pero en ausencia de la micobacteria (SN –/+ BCG). **27.1.** Porcentaje de células NK que representa la subpoblación CD56<sup>bright</sup> en cada cultivo. **27.2.** Porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> que desgranulan en respuesta a las diferentes células tumorales uroteliales tras los distintos tratamientos. **27.1 y 27.2.** Se representa la media y la SEM. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student, \* p<0,05, n.s. no significativo. (n=4).

las células tumorales uroteliales, a pesar de no ser ésta estadísticamente significativa. Esto puede deberse a que estos PBMCs estuvieron en presencia de factores solubles que estimulan la activación de las células NK desde el tiempo 0 del cultivo, mientras que, en el caso del tratamiento con BCG, los factores solubles se van acumulando a lo largo de la semana de estimulación, haciendo que la activación y diferenciación de las células NK tenga lugar de manera más progresiva.

Con el fin de confirmar estos resultados, utilizando un citómetro de flujo separador, se purificaron células NK CD56<sup>bright</sup> y células NK CD56<sup>dim</sup> por separado y se utilizaron en ensayos en placa con soportes permeables *transwell*, cuyas membranas tenían un poro de 0,4  $\mu\text{m}$ , que no permiten la migración de las células pero sí el paso de factores solubles. Así, se pusieron las células NK de las dos subpoblaciones por separado sobre el soporte permeable y, en el fondo del pocillo, se pusieron PBMCs totales en presencia o ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), y se incubaron durante una semana. Tras ese tiempo, se recogieron las células NK purificadas del *transwell* y se analizaron por citometría de flujo para ver si se había generado la población citotóxica CD56<sup>bright</sup>. La *figura 28*, muestra los resultados obtenidos con dos donantes: en uno de ellos se produjo una gran expansión de la subpoblación CD56<sup>bright</sup> tras



**Figura 28.** Efecto de los factores solubles liberados en los cultivos sin estimular o estimulados con BCG en la diferenciación de las células NK tras 7 días en cultivo. Se incubaron PBMCs en presencia y ausencia de BCG y se pusieron células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>, por separado, sobre soportes permeables *transwell*, cuyo poro de membrana era de 0,4  $\mu\text{m}$ , durante 7d. Tras ese tiempo, se analizaron los cambios ocurridos en ambas subpoblaciones de células NK debidos, exclusivamente, a los factores solubles liberados por el cultivo que se encontraba en el fondo del pocillo. Como control, se analizó la población de células NK en el total de PBMCs. **28.1.** Histogramas de citometría de flujo representativos de la intensidad de fluorescencia media de CD56 en las células NK del control y en las dos subpoblaciones de células NK que estuvieron sobre el *transwell*. **28.2.** Gráficos de citometría de flujo representativos de los niveles de expresión del receptor CD16 en las dos subpoblaciones de células NK que se incubaron sobre los *transwells*. (n=2).



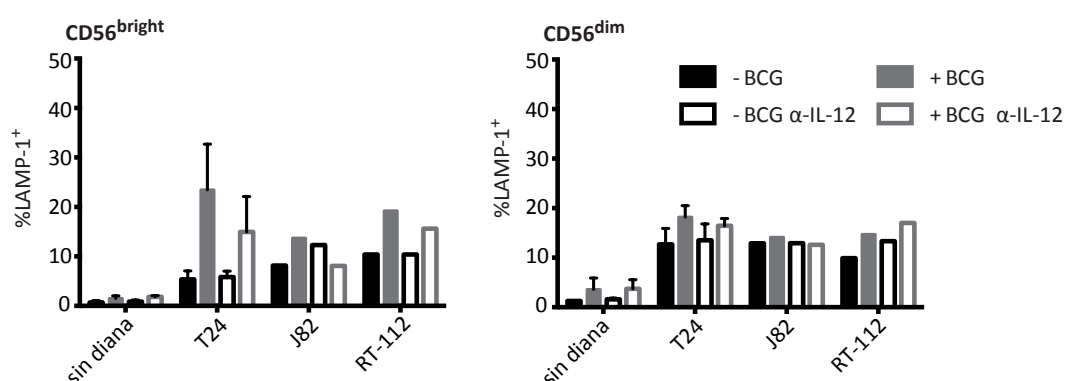
la exposición a BCG (donante 2), mientras que en el otro esta expansión fue más moderada (donante 1). En ambos casos se produjo un aumento en el MFI de CD56, tanto en la población de células NK CD56<sup>bright</sup> como en la CD56<sup>dim</sup>, debido a los factores solubles liberados en respuesta a la micobacteria (*figura 28.1*). Además, al igual que se vio en la *figura 21.3*, el hecho de que aumente el MFI de CD56 en la población CD56<sup>dim</sup> favorece que la nueva población CD56<sup>bright</sup> exprese los receptores CD16 (*figura 28.2*), KIR, CD57 y CD94 (datos no mostrados).

Estos datos indican que los factores solubles son muy importantes en la diferenciación de las células NK hacia la población de células NK CD56<sup>bright</sup> citotóxica. Además, queda demostrado que no es necesario el contacto directo de las células NK ni con la micobacteria ni con otras células del cultivo para que se produzca esa diferenciación. Por tanto, en conjunto, estos datos sugieren que la estimulación con BCG de otras poblaciones celulares produce la secreción de factores solubles capaces de estimular la diferenciación de las células NK.

### 3.11. EL ANÁLISIS DE LOS FACTORES SOLUBLES REVELA DIFERENCIAS ENTRE LOS CULTIVOS SIN ESTIMULAR Y ESTIMULADOS CON BCG

La interleuquina-12 (IL-12) es una citoquina producida por células presentadoras de antígeno que tiene un papel muy importante en el desarrollo de la respuesta Th1, así como en la activación de células citotóxicas: células NK y células T (Lasek et al. 2014). Defectos en esta citoquina o en su receptor se han asociado con infecciones severas asociadas a micobacterias (Dorman and Holland 2000). Por tanto, esta citoquina podría ser una de buena candidata para desempeñar un papel importante en la respuesta de las células NK al tratamiento con BCG.

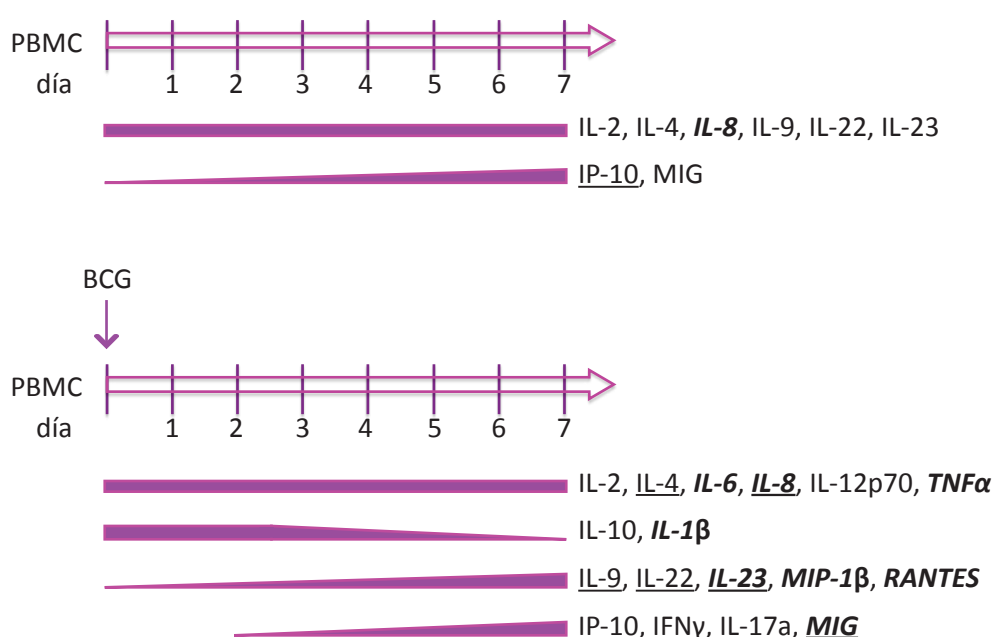
Con el fin de comprobar esto, se incubaron PBMCs en presencia y ausencia de BCG en los que se bloqueaba o no la IL-12. Tras los 7 días de estimulación, se utilizaron las células en ensayos de desgranulación frente a las células tumorales uroteliales. Pese a tratarse de datos



**Figura 29.** Papel de la IL-12 en la generación de la población de células NK CD56<sup>bright</sup> citotóxicas en respuesta a BCG. Se incubaron PBMCs en presencia y ausencia de BCG y en presencia y ausencia de anticuerpos anti-IL12p70 a una concentración de 10 ng/ml durante 7d (añadiendo más anticuerpo al medio de cultivo tras 3 y 6 días para evitar que se agotase). Tras ese tiempo, se utilizaron las PBMCs en ensayos de desgranulación frente a células tumorales uroteliales. Se representa el porcentaje de células NK desgranulando como el %LAMP-1<sup>+</sup> en la región de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, analizando por separado las subpoblaciones CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>.

preliminares, en la *figura 29* se puede observar cómo el bloqueo de la IL-12 fue capaz de producir una inhibición parcial en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> que responden frente a las líneas tumorales uroteliales tras la estimulación con BCG, mientras que apenas tuvo efecto en las células NK CD56<sup>dim</sup> estimuladas con BCG ni en las células sin estimular con BCG, tanto CD56<sup>bright</sup> como CD56<sup>dim</sup>.

Estos datos preliminares dirigieron el estudio hacia el análisis de las citoquinas que se producen en el cultivo estimulado con BCG a lo largo del tiempo. En colaboración con la Dra. Omodele Ashiru, del grupo de la Dra. Mei M. Ho (*National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK*), se analizó, por Luminex, el contenido de citoquinas y quimioquinas en los sobrenadantes de tres cultivos de PBMCs en presencia y ausencia de BCG diariamente durante 7 días, observándose distintos patrones (*figura 30*).



**Figura 30.** Resumen de las citoquinas y quimioquinas que se liberan en los cultivos *in vitro* de PBMCs en presencia y ausencia de BCG. En **negrita y cursiva** se representan aquellos factores solubles cuya concentración es mayor de 1000 pg/ml. Subrayados se representan aquellos factores solubles presentes tanto en los cultivos con BCG como en los que no había BCG, pero cuya concentración es mayor en la condición en la que está subrayada.

Se detectó IL-2 a una concentración similar en ambos cultivos, tanto estimulados como sin estimular con BCG, que se mantenía con el tiempo, lo que probablemente esté permitiendo la supervivencia de los cultivos a lo largo de la semana. También se detectaron, tanto en los cultivos estimulados como en los cultivos sin estimular, IL-4, IL-8, IL-9, IL-22, IL-23 y MIG. La concentración de estas citoquinas se mantuvo constante en los cultivos sin estimular. En los cultivos estimulados con BCG, la concentración de IL-4 e IL-8 también se mantuvo constante. Sin embargo, la concentración de IL-9, IL-22, IL-23 y MIG fue aumentando en el cultivo estimulado con la micobacteria a lo largo de la semana, excepto en el caso de MIG, cuya concentración no empezó a aumentar hasta el día 3 del co-cultivo. Para todas estas citoquinas, la concentración fue mayor en los cultivos de células estimuladas con BCG que en los cultivos sin estimular.



En cuanto a las citoquinas que sólo se detectaron en los cultivos estimulados con BCG, se encontró IL-6, IL-12p70 y TNF $\alpha$ , cuya concentración se mantuvo constante desde el día 1. Curiosamente, la IL-6 y el TNF $\alpha$  se detectaron en la orina de los pacientes inmediatamente después de las instilaciones de BCG (Bisiaux et al. 2009), mientras que la IL-12 ya apuntaba a que podría ser importante para el aumento de la citotoxicidad de las células NK CD56<sup>bright</sup> (figura 29). En los dos primeros días del co-cultivo con BCG también se detectó IL-10 e IL-1 $\beta$ , aunque su concentración fue disminuyendo con el paso de la semana. Sin embargo, la mayoría de las citoquinas analizadas aumentaban su concentración con el paso del tiempo. Así, MIP-1 $\beta$  y RANTES se detectaron a concentraciones crecientes desde el día 1, mientras que IFN $\gamma$  e IL-17a, comenzaron a aumentar su concentración a partir del día 3 del co-cultivo con BCG.

Algo parecido ocurrió con IP-10. Esta quimioquina, a pesar de aumentar en ambos cultivos, en el cultivo sin estimular este aumento comenzó en el día 1 del cultivo, mientras que, en los cultivos estimulados con BCG, no se detectó hasta el día 3 del co-cultivo, aunque este retraso se podría explicar por la alta concentración de IL-10 al principio del co-cultivo con BCG (Tebbo et al. 1998).

Además, se detectaron diferencias significativas entre las concentraciones de las diferentes citoquinas, siendo menores de 1000 pg/ml en ambos cultivos en el caso de IL-2, IL-4, IL-9, IL-22 e IP-10, en los cultivos estimulados con BCG en el caso de IFN $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-17a y en los cultivos sin estimular en el caso de IL-23 y MIG. Por su parte, la concentración fue mayor de 1000 pg/ml en ambos cultivos en el caso de IL-8, y en los cultivos estimulados con BCG en el caso de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, MIG, MIP-1 $\beta$ , RANTES y TNF $\alpha$  (Figura suplementaria 1).

En resumen, el patrón de citoquinas que se encuentra en estos co-cultivos a tiempos cortos se ajusta muy bien con la respuesta inflamatoria primaria que se detecta en la orina de los pacientes tras haber transcurrido poco tiempo desde la instilación de la micobacteria en la vejiga (Bisiaux et al. 2009). Además, el análisis de los sobrenadantes tras varios días en cultivo, muestra que se produce un aumento considerable de otros factores solubles asociados con la inmunidad innata y con la respuesta a patógenos que supondría una segunda oleada de moléculas que podrían contribuir a una mayor activación de las células del sistema inmunitario y que, por consiguiente, ayudarían en la eliminación del tumor.

Así, estos datos sugieren que los factores solubles podrían ser buenos biomarcadores de respuesta al tratamiento con BCG para el cáncer de vejiga. Además, dada la alta tasa de abandono debido a los efectos secundarios del tratamiento con BCG, sería muy interesante estudiar el uso de una combinación específica de citoquinas y quimioquinas como alternativa al tratamiento con BCG de tal forma que, tras ser instilada en la vejiga de los pacientes con cáncer, fuera capaz de activar a las células NK para que pudieran responder frente a las células tumorales uroteliales.

#### 4. ESTUDIO PILOTO EN UNA COHORTE DE PACIENTES CON CÁNCER DE VEJIGA NO MÚSCULO-INVASIVO TRATADOS CON BCG

---

En paralelo a los ensayos *in vitro*, se planteó un estudio piloto con una pequeña cohorte de pacientes con cáncer de vejiga tratados con BCG en el que se analizaron numerosos parámetros. Los objetivos del estudio eran, por una parte, validar el modelo *in vitro* y, por otra, realizar un estudio nuevo para analizar la contribución de las células NK en la respuesta inmunitaria al tratamiento. Lo que diferencia a este estudio del resto de estudios realizados hasta el momento, es que, en la mayoría de los estudios se analizan las muestras recogidas tras pocas horas o como máximo 2 días desde la instilación de BCG en la vejiga de los pacientes (Bisiaux et al. 2009; Zuiverloon et al. 2012), sin embargo, en nuestro estudio se analizó la respuesta al tratamiento mantenida, al recoger las muestras tras una semana o 3 meses después de la última instilación, dependiendo de si el punto que se recoge es dentro de un ciclo o al principio de un ciclo nuevo. El objetivo último del estudio sería comprobar si alguno de los parámetros estudiados podría utilizarse como factor pronóstico de la respuesta al tratamiento para, en un estudio posterior a mayor escala, poder verificar su capacidad para predecir si un paciente va a responder a la terapia o no.

108 | Para ello, se contó con una cohorte estudio compuesta por 10 pacientes con cáncer de vejiga superficial de alto grado tratados con BCG y una cohorte control de 7 pacientes con cáncer de vejiga superficial de bajo grado tratados con mitomicina C (MMC). De esta forma, la comparación se realizó entre dos grupos de pacientes con cáncer de vejiga, en los que las mayores diferencias a nivel inmunológico serán consecuencia del tratamiento con la micobacteria.

Con el fin de estudiar un número relativamente alto de parámetros, se analizaron muestras de sangre y orina, tanto a nivel celular, como a nivel de factores solubles. Se recogieron las muestras de sangre y orina en los tiempos indicados (*figura 4*) y se procesaron tal y como se explica en el apartado de “*Materiales y métodos*” correspondiente. Así, en sangre total, se analizaron por citometría de flujo las poblaciones celulares, prestando mucha atención a las poblaciones de células NK, así como a muchos de sus receptores y marcadores de activación o función, a la vez que se almacenaron muestras de plasma y PBMCs congelados. Por otra parte, en las muestras de orina se intentó, por un lado, poner a punto el análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares presentes en ella, y también se almacenaron los sobrenadantes congelados para el estudio de factores solubles. En esta tesis se mostrarán sólo los resultados que conciernen a la población NK y subpoblaciones CD56, aunque el estudio incluyó marcadores de otras poblaciones celulares, así como moléculas de activación y maduración.

En general, para determinar la buena respuesta al tratamiento, se suele hablar de supervivencia a 3 ó 5 años. Para esta tesis nos hemos centrado en el análisis de los datos hasta el cuarto ciclo en los pacientes tratados con BCG y el tercer ciclo en los tratados con MMC.

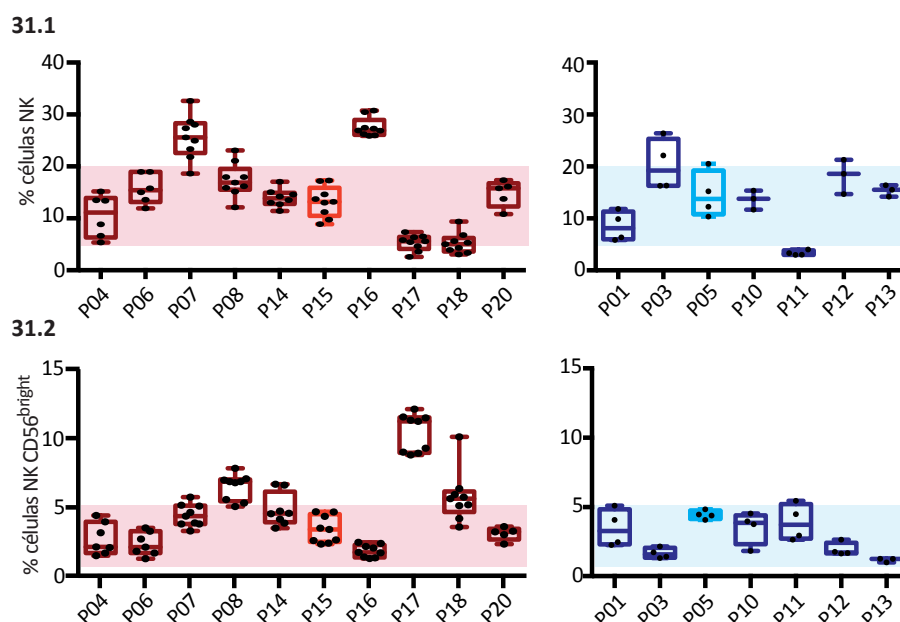
De esta forma, se cubre todo el primer año de tratamiento con la micobacteria, con el fin de poder identificar biomarcadores “tempranos” de buena o mala respuesta al tratamiento. Sin embargo, el seguimiento de los pacientes hasta que se cumplan los 5 años de tratamiento es importante para poder interpretar mejor los datos obtenidos.

De los datos clínicos obtenidos hasta el momento, solamente hay un caso de recidiva en un paciente (P15) de los 10 tratados con BCG, y un caso de fallecimiento en un paciente (P05) tratado con MMC.

#### 4.1. EL PORCENTAJE DE CÉLULAS NK Y EL DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> NO CAMBIA EN SANGRE PERIFÉRICA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON BCG

Con el fin de comprobar el estado de las poblaciones de células NK en los pacientes y las variaciones que éstas sufren a consecuencia del tratamiento, se analizaron, mediante tinción directa de sangre total, los cambios producidos en la población de células CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> a lo largo del tiempo de tratamiento. Sin embargo, el porcentaje que representan las células NK en el total de linfocitos no parecen verse afectados durante el tratamiento con BCG (*figura 31.1*). Como era de esperar, tampoco hubo cambios en la población de células NK en los pacientes tratados con MMC (*figura 31*). De hecho, las mayores diferencias en los niveles de células NK con respecto al total de linfocitos se observan entre los distintos pacientes, más que en cada

| 109



**Figura 31.** Análisis de las células NK en muestras de sangre total de pacientes con cáncer de vejiga tratados con BCG o con MMC. Se analizaron las muestras de sangre total por citometría de flujo multiparamétrica. Se representa el porcentaje de las células NK (31.1) en el total de linfocitos, y el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> (31.2) dentro de la región de células NK. Se representan los datos en diagramas de cajas. Los símbolos representan los porcentajes de células NK (totales o CD56<sup>bright</sup>) de cada paciente durante los primeros ciclos de tratamiento (BCG de B1.1 a B4.2, MMC de M1.1 a M3.1). Los pacientes P15 (BCG) y P05 (MMC) se representan en un color diferente ya que el primero ha tenido recidiva y el segundo falleció. Los valores habituales de ambas poblaciones se representan por una sombra.

paciente a lo largo del tratamiento, sin importar que éste fuera tratado con BCG o MMC.

Si se presta atención al porcentaje que las células NK CD56<sup>bright</sup> representan en el total de células NK (*figura 31.2*), el cual raramente supera el 5% en sangre periférica en condiciones normales, es llamativo el hecho de que en más de la mitad de los pacientes tratados con BCG, se supera ese valor en algunos puntos del tratamiento. Además, este aumento en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> no parece estar relacionado con el porcentaje que representa la población de células NK en el total de linfocitos (*figura 31.1*). Cuando se compara entre los pacientes tratados con BCG y los pacientes tratados con MMC se puede comprobar cómo en los pacientes incluidos en este segundo grupo, el porcentaje de esta subpoblación de células NK está dentro de ese rango en todos ellos (*figura 31.2*). Obviamente, es necesario comprobar esta tendencia en un mayor número de pacientes para poder comprobar si realmente existe una diferencia en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> con el tratamiento y si se puede inferir algún valor predictivo de este dato.

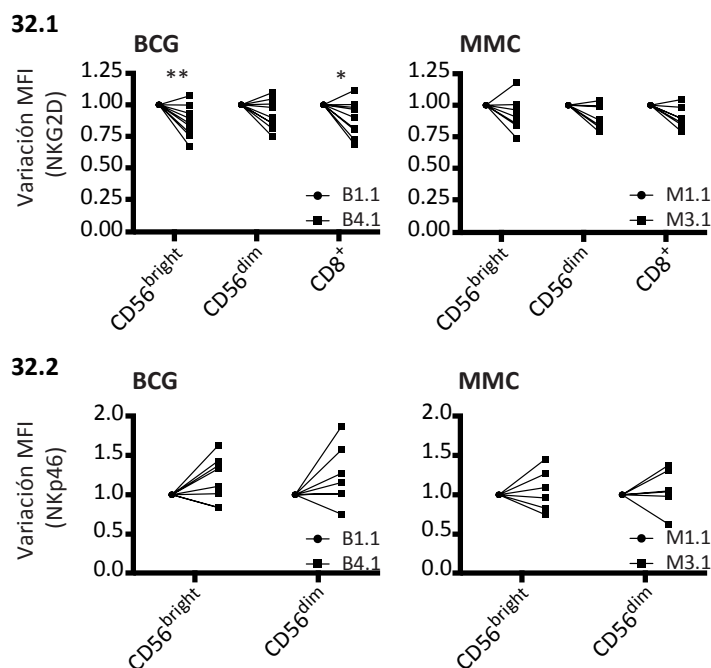
Además, los niveles de células NK y, más concretamente, los de la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> fueron normales (no aumentados) tanto en el paciente con recidiva (P15) como en el paciente fallecido (P05) a lo largo del estudio.

Dado que se están estudiando los cambios a nivel de sangre periférica, se puede entender que no se detecten diferencias en cuanto a los niveles de estas células. Sin embargo, el estudio del porcentaje de células NK y, más concretamente, de la subpoblación CD56<sup>bright</sup> que se encuentran en la vejiga de los pacientes, podría ser más indicativo de la respuesta de estas células al tratamiento con BCG.

#### 4.2. LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NKG2D DISMINUYEN EN LAS CÉLULAS NK CD56<sup>BRIGHT</sup> EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO, MIENTRAS QUE LOS NIVELES DE NKP46 Y CD16 NO VARÍAN

Dada la importancia de los receptores NKG2D y Nkp46 en el reconocimiento y la respuesta de las células NK (de donantes sanos) activadas frente a células tumorales uroteliales (*figura 9.1 y figura 23*), se decidió estudiar qué ocurría con los niveles de estos receptores en las células de los pacientes a lo largo del tratamiento, también a nivel de sangre periférica. Así, se comparó la intensidad media de fluorescencia de estos receptores justo antes de comenzar el tratamiento (B1.1 o M1.1) y justo antes de la primera instilación del cuarto ciclo (B4.1) en los pacientes tratados con BCG, y del tercer ciclo (M3.1) en los pacientes tratados con MMC.

El receptor NKG2D se expresa tanto en células NK como en células T CD8<sup>+</sup> en ambas cohortes de pacientes. Sin embargo, los patrones de expresión son distintos en los diferentes tipos celulares: la intensidad de fluorescencia media de este receptor es mayor en las células NK CD56<sup>bright</sup> y en las células T CD8<sup>+</sup>, que en las células NK CD56<sup>dim</sup> (datos no mostrados). De hecho,



**Figura 32.** Análisis de los niveles de expresión de receptores activadores en distintas poblaciones celulares de las muestras de sangre total de pacientes con cáncer de vejiga tratados con BCG o con MMC. Los valores de la intensidad de fluorescencia tras un año de tratamiento en el caso de BCG (B4.1) o tras 4 meses de tratamiento en el caso de MMC (M3.1) se normalizaron con respecto al valor inicial (B1.1 y M1.1) para el análisis estadístico. **32.1.** La intensidad media de fluorescencia de NKG2D se determinó en varias poblaciones linfocitarias en los pacientes a distintos puntos de tratamiento. El rango de intensidad de fluorescencia se situaba entre 30 y 80 en las células NK CD56<sup>bright</sup>, entre 30 y 70 en las células NK CD56<sup>dim</sup> y entre 40 y 70 en las células T CD8<sup>+</sup>, tanto para pacientes tratados con BCG durante 1 año (de B1.1 a B4.1), como para pacientes tratados con BCG durante 4 meses (de M1.1 a M3.1). Para la comparación

normalizada, se aplicó el test t de Student utilizando el método Sidak-Bonferroni, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ . **32.2.** La intensidad media de fluorescencia de Nkp46 se determinó en las dos poblaciones de células NK en los pacientes a distintos puntos de tratamiento. El rango de intensidad de fluorescencia se situaba entre 2 y 18 en las células NK CD56<sup>bright</sup> y entre 1,5 y 10 en las células NK CD56<sup>dim</sup>, en la misma cohorte de pacientes. El aumento en la intensidad de fluorescencia media de Nkp46 no fue estadísticamente significativo.

es en estas dos primeras poblaciones celulares, en las que se ve un cambio significativo tras los 3 primeros ciclos de tratamiento con BCG, de tal forma que la intensidad de fluorescencia media del receptor NKG2D desciende en la mayoría de los pacientes (*figura 32.1*).

Por otra parte, ya que se ha descrito que, en algunas enfermedades, las células T CD4<sup>+</sup> también pueden expresar el receptor NKG2D (Dai et al. 2009; Huergo-Zapico et al. 2014), también se estudiaron los niveles de este receptor en las células T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con cáncer de vejiga superficial incluidos en este estudio. Sin embargo, en ningún paciente se vio expresión de NKG2D en la población de células T CD4<sup>+</sup>, sin importar el tipo de tratamiento (datos no mostrados).

Por su parte, el receptor Nkp46 sólo se expresa en las células NK (Walzer et al. 2007; Strauss-Albee et al. 2014). En los pacientes estudiados, se ha visto que su expresión está restringida a la subpoblación CD56<sup>bright</sup> (datos no mostrados). Sin embargo, no se aprecian cambios significativos en ninguna de las dos subpoblaciones de células NK a consecuencia del tratamiento con BCG (*figura 32.2*).

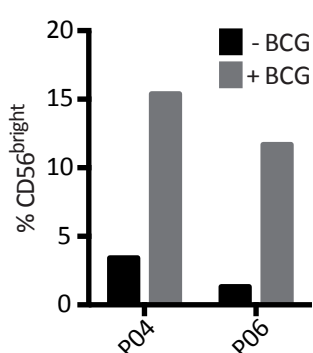
Por último, dado que, en los ensayos *in vitro*, la expansión de la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> en respuesta a BCG va acompañada de un aumento en la intensidad media de fluorescencia del receptor CD16, se analizaron también los niveles de expresión de este receptor en las células NK. Sin embargo, tampoco hubo diferencias significativas en la intensidad media de fluorescencia de CD16 en ninguna de las dos subpoblaciones de células

NK (datos no mostrados).

En este caso, también el paciente con recidiva (P15) y el paciente fallecido (P05) siguieron la misma tendencia que el resto para estos marcadores.

#### 4.3. LAS PBMCs DE PACIENTES DE CÁNCER DE VEJIGA TAMBIÉN GENERAN NK CD56<sup>BRIGHT</sup> TRAS LA ESTIMULACIÓN CON BCG *IN VITRO*

Dado que las células NK que procedían de donantes sanos eran capaces de responder a la estimulación con BCG mediante la expansión de una nueva subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup>, se estudió si las PBMCs de dos pacientes de cáncer de vejiga superficial tratados con BCG (P04 y P06) también eran capaces de responder de la misma manera. Para ello, se incubaron las PBMCs de estos pacientes en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50, durante 7 días y, tras ese tiempo, se analizaron las características fenotípicas de las células NK. En la *figura 33* se puede observar que, en ambos casos, se produjo una expansión de la población CD56<sup>bright</sup> en respuesta al tratamiento con BCG. Además, en ambos pacientes, la población CD56<sup>bright</sup> que se generó en respuesta a BCG expresaba CD16, KIR, CD57 y CD94 (datos no mostrados), al igual que ocurría cuando la expansión se producía en células NK procedentes de donantes sanos (*figura 18*).



**Figura 33.** Respuesta de las células NK de dos pacientes de cáncer de vejiga tratados con BCG a la estimulación con BCG *in vitro* en el contexto del total de PBMCs. Se co-incubaron PBMCs de los pacientes en presencia y ausencia de BCG, a una ratio 1:50 (BCG : PBMC), durante 7 días. Tras ese tiempo, se analizaron las poblaciones celulares por citometría de flujo. Se representa el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> en el total de células NK.

Estos datos apuntan a que la generación de la población de células NK CD56<sup>bright</sup> en respuesta a la estimulación con BCG *in vitro* ocurre tanto a partir de PBMCs purificados de donantes sanos, como de pacientes con cáncer de vejiga tratados con BCG.

#### 4.4. EL ANÁLISIS DE LOS FACTORES SOLUBLES EN LA ORINA DE LOS PACIENTES TRATADOS CON BCG REVELA UN POSIBLE PAPEL PARA LA QUIMIOQUINA IP-10 COMO BIOMARCADOR

En los estudios publicados hasta la fecha que miden el contenido de citoquinas en orina, las determinaciones se hacían a tiempo muy cortos tras la instilación de la micobacteria en la vejiga de los pacientes. Así, el patrón de citoquinas observado es el típico de una respuesta

inflamatoria temprana, en la que destaca la presencia de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 ((Bisiaux et al. 2009), revisado en (Zuiverloon et al. 2012)). Curiosamente, estas citoquinas también se observaron en los co-cultivos *in vitro* de PBMCs con BCG a concentraciones relativamente altas (figura 30 y figura suplementaria 1).

A diferencia de aquellos artículos, el objetivo de este estudio piloto era determinar qué parte de esa respuesta proinflamatoria temprana, producida a consecuencia de la micobacteria, se mantenía tras los diferentes periodos de descanso (siete días dentro de los ciclos y tres meses entre ciclo y ciclo) generando una respuesta inmunitaria favorable a la eliminación del tumor. Para ello, una vez más en colaboración con la Dra. Omodele Ashiru, del grupo de la Dra. Mei M. Ho (*National Institute for Biological Standards and Control, Potters Bar, UK*), se analizó, por Luminex, el contenido en citoquinas y quimioquinas en los sobrenadantes de las orinas de 9 de los 10 pacientes tratados con BCG, hasta el cuarto ciclo de tratamiento, de 6 de los 7 pacientes tratados con MMC, hasta el tercer ciclo de tratamiento, y de donantes sanos.

En la *tabla 3* se muestra, de manera muy resumida, el análisis de los resultados obtenidos. Éstos revelaron gran variabilidad entre los diferentes pacientes a lo largo del tratamiento (figura suplementaria 2).

Citoquina/Quimioquina	BCG	MMC	sanos
IL-1 $\beta$ (>40 pg/ml)	3/9	-	-
IL-2 (>50 pg/ml)	3/9	5/6	-
IL-4	-	-	-
IL-6 (>50 pg/ml)	5/9	3/6	-
IL-8 (>200 pg/ml)	4/9	5/6	-
IL-10	-	-	-
IL-12p70	-	-	-
IL-17a	-	-	-
IL-18BP $\alpha$	+	+	+
IL-22	+	+	+
IL-23	+	+	+
TNF $\alpha$	-	-	-
IFN $\gamma$	-	-	-
TGF $\beta$	-	-	-
MIP1 $\beta$	-	-	-
MIG	-	-	-
IP-10 (>50 pg/ml)	9/9	2/6	-
RANTES (>50 pg/ml)	4/9	1/6	-
TRAIL (>50 pg/ml)	3/9	3/6	-

**Tabla 3.** Resumen de las citoquinas y quimioquinas detectadas en la orina de donantes sanos y de pacientes con cáncer de vejiga tratados con BCG (hasta el cuarto ciclo) o con MMC (hasta el tercer ciclo). -: ausencia de citoquinas, +: presencia de citoquinas, fracción: muestras positivas/total.

Sin embargo, hubo una quimioquina, IP-10 (CXCL-10), que aumentó su concentración en la orina de casi todos los pacientes con cada ciclo (de B1.1 a B1.6, de B2.1 a B2.2, de B3.1 a B3.2 y de B4.1 a B4.2), volviendo a estar en niveles bajos tras los 3 meses de descanso entre ciclos (B2.1, B3.1 y B4.1). Curiosamente, en el paciente P15, el único que mostró recidiva tras dos años de tratamiento, la concentración de IP-10 no mostró el mismo patrón, apenas



alcanzando los 50 pg/ml durante los 3 primeros ciclos. Este dato sugiere que la medida de la concentración de IP-10 tras 7 días desde la última instilación en los primeros ciclos de tratamiento podría utilizarse como indicativo de buena respuesta al tratamiento con BCG. Sin embargo, otro paciente, P08, también tuvo una baja concentración de IP-10 en orina, que no aumentaba en los ciclos de tratamiento y, tras 2 años y 4 meses en tratamiento (fecha del último reconocimiento), no ha mostrado recidiva. Por tanto, sería muy interesante poder analizar la concentración de IP-10 en la orina de un mayor número de pacientes a lo largo del tratamiento, de tal forma se pueda comprobar si realmente la medida de IP-10 a día 7 tras la última instilación serviría como marcador de buen pronóstico.

IP-10 (del inglés "*IFN $\gamma$ -induced protein 10*"), también conocida como CXCL10, es una quimioquina que se induce en respuesta a IFN $\gamma$ . Así, a pesar de no haberse detectado IFN $\gamma$  en la orina de los pacientes una semana después de la última instilación, este dato podría ser consistente con los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, en los que se vio que la respuesta mediada por IFN $\gamma$  se producía a tiempos más cortos, ayudando así al mantenimiento de la respuesta inmunitaria innata.

En cualquier caso, la comparación entre las citoquinas y quimioquinas detectadas *in vivo*, en la orina de los pacientes, y las detectadas *in vitro*, en los co-cultivos de PBMCs con BCG, es complicada. Por una parte, en los pacientes, las citoquinas y quimioquinas producidas se eliminan con cada micción, mientras que *in vitro* se acumulan en el cultivo. Además, las poblaciones celulares *in vitro* pueden desaparecer con el tiempo de cultivo, mientras que *in vivo* constantemente pueden estar llegando diferentes poblaciones celulares a la vejiga de los pacientes.

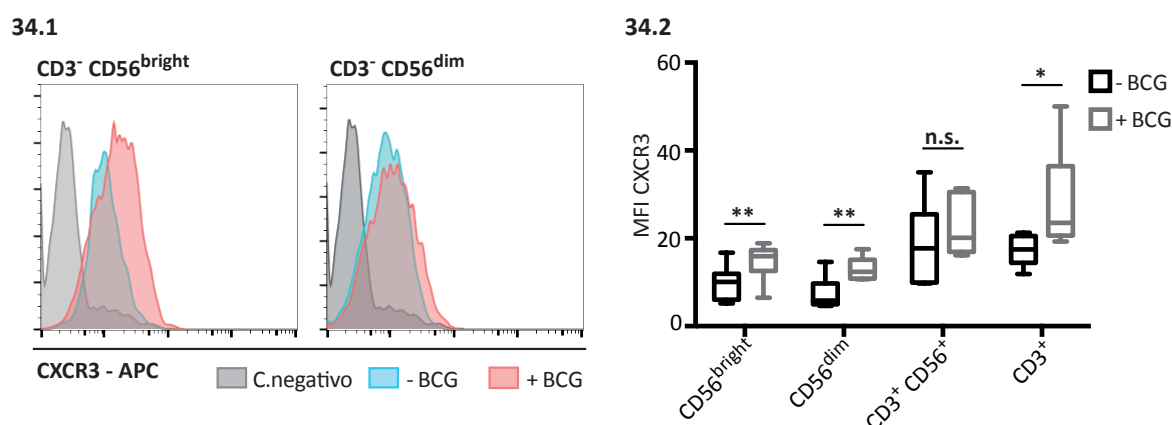
Por último, se puede concluir también que el patrón de factores solubles liberados por los pacientes tratados con BCG es diferente al observado en los pacientes tratados con MMC. De hecho, los factores solubles detectados en la orina de los pacientes tratados con MMC se correlacionan, la mayor parte de las veces, con la presencia de sangre en orina (datos no mostrados).

Además, la orina de los donantes sanos tampoco contenía factores solubles, a excepción de IL-22, IL-23 e IL-18BP $\alpha$ , que también se detectó en la orina de ambos grupos de pacientes de cáncer de vejiga (*tabla 3* y *figura suplementaria 2*). Sin embargo, la concentración de IL-18BP $\alpha$  fue superior en los pacientes tratados con BCG. La IL-18BP $\alpha$  (del inglés "*IL-18-binding protein*") es una proteína que bloquea la IL-18, encargada de inducir la expresión de IFN $\gamma$ . Como ya se mencionó anteriormente, tras 7 días desde la última instilación, no se detectó IFN $\gamma$  aunque sí IP-10. El hecho de que se detecte una alta concentración de IL-18BP $\alpha$  también podría explicar esa ausencia de IFN $\gamma$ , aunque sería necesario estudiar, a tiempos más cortos (tras 3 y 7 días desde la última instilación), los niveles de estos factores solubles en una cohorte mayor de pacientes.



#### 4.5. LA ESTIMULACIÓN *IN VITRO* CON BCG PRODUCE UN AUMENTO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE IP-10 (CXCR3) EN LAS CÉLULAS NK

Varios estudios han relacionado la presencia de IP-10 en plasma con una respuesta específica a antígenos de *Mycobacterium tuberculosis*, en pacientes de tuberculosis (revisado en (Ruhwald et al. 2012)). Tras comprobar el posible papel de IP-10 en la respuesta al tratamiento con BCG en los pacientes de cáncer de vejiga superficial incluidos en nuestro estudio (*figura suplementaria 2*), y después de haber visto que esta quimioquina aumentaba su concentración durante el tiempo de cultivo en los ensayos *in vitro* (*figura 30* y *figura suplementaria 1*), se decidió estudiar la expresión de su receptor, CXCR3, en distintas poblaciones celulares tras la estimulación de PBMCs de donantes sanos con BCG. Para ello, tras la semana de co-incubación, se midió la intensidad de fluorescencia de este receptor en la superficie de las diferentes poblaciones celulares. Como se puede observar en la *figura 34*, los niveles de expresión de esta molécula aumentaron de manera significativa en las dos subpoblaciones de células NK, así como en la población de células T CD3<sup>+</sup> que ya era positiva para CXCR3.



**Figura 34.** Efecto de BCG en los niveles de expresión del receptor de IP-10, CXCR3, en células NK. **34.1.** Histogramas de citometría de flujo representativos del nivel de expresión de CXCR3 en las dos subpoblaciones de células NK tras haber sido incubadas durante 1 semana, en el contexto del total de PBMCs, en presencia (rojo) o ausencia (azul) de BCG. En gris, se representa la intensidad de fluorescencia de CXCR3 en una población del cultivo negativa para este receptor. **34.2.** Intensidad de fluorescencia media (MFI) de CXCR3 en las subpoblaciones de células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>, así como en la población de células T CD3<sup>+</sup> y en la CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, tras haber sido estimuladas o no con BCG. Los datos se representan en diagramas de cajas. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras relacionadas, \* p<0,05, \*\* p<0,01. (n=6).

El aumento en la concentración de IP-10 en la orina de los pacientes respondedores a la inmunoterapia con BCG, dada su función como quimioatrayente, sugiere que esta quimioquina puede ser muy importante en el reclutamiento de diferentes poblaciones celulares, entre ellas las células NK, así como su mantenimiento en la vejiga. Además, el hecho de que, en presencia de BCG, las poblaciones de células citotóxicas aumenten la expresión de su receptor apoyaría la importancia de ésta molécula en la respuesta inmunitaria a la inmunoterapia con BCG del cáncer de vejiga superficial.

# DISCUSIÓN

En la actualidad, el tratamiento más efectivo para el cáncer de vejiga superficial es la inmunoterapia con BCG. La instilación intravesical de esta micobacteria produce el reclutamiento y la activación de diferentes poblaciones celulares del sistema inmunitario a la vejiga. Entre ellas, las células NK han demostrado tener un papel principal en la buena respuesta al tratamiento tras comprobarse que, en modelos murinos deficientes en estas células citotóxicas, el tratamiento no es efectivo (Brandau and Böhle 2001; Brandau et al. 2001). A pesar de que ciertos aspectos de la interacción entre BCG y las células NK se habían estudiado previamente, el efecto que la micobacteria produce sobre las células NK y cómo afecta esto a la respuesta frente a las células tumorales se había explorado poco. Con el fin de estudiar en detalle la manera en que BCG afecta a la función de las células NK, en el contexto de la inmunoterapia para el cáncer de vejiga, se plantearon dos modelos paralelos que podrían validarse mutuamente: por una parte, el estudio *in vitro* de la interacción entre las células uroteliales tumorales con las células NK así como el papel de la micobacteria en esta interacción y, por otra, un estudio piloto en pacientes que permitiera analizar la respuesta de las células NK, así como de otras células del sistema inmunitario, a lo largo del tratamiento.

Sin duda, el resultado más llamativo obtenido ha sido el aumento en la fracción de células NK que expresan altos niveles de CD56 tras la incubación de PBMCs totales con BCG. Esta nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> no sólo pasa a representar un mayor porcentaje del total de células NK en respuesta a BCG, sino que, sorprendentemente, también se diferencia de la población de células NK CD56<sup>bright</sup> clásica a nivel fenotípico y funcional, adquiriendo nuevos marcadores de superficie y una gran capacidad citotóxica frente a las células tumorales uroteliales. Investigando más a fondo sobre su origen en los cultivos, se observó que la mayor parte de esta nueva población de células CD56<sup>bright</sup> procede de la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> inicial, que aumenta el nivel de expresión de CD56 tras la incubación del total de PBMCs con BCG. Esto permite explicar tanto la expresión de las nuevas moléculas de superficie, que normalmente no están asociadas con la población de células NK CD56<sup>bright</sup>, como la función citotóxica de esta nueva población, que suele estar asociada con la subpoblación CD56<sup>dim</sup>. Además, a pesar de que se han detectado pocos cambios en el número de células NK a nivel de sangre periférica en los pacientes de cáncer de vejiga tratados con BCG, en las muestras de orina se han detectado cambios importantes en ciertos factores solubles que también se pueden explicar por varios de los eventos detectados en la respuesta a BCG *in vitro*.

Inicialmente, se partió de la hipótesis de que, si las células NK eran importantes en la buena respuesta al tratamiento, esto se debería a que, tras la estimulación con BCG, tendrían mayor capacidad para reconocer y eliminar a las células tumorales de manera eficiente. Esto implicaría que, por acción de BCG, las células tumorales uroteliales podrían sufrir cambios que modularan la expresión en superficie de ligandos para las células NK y, a su vez, que las células NK también podrían sufrir cambios en sus receptores que modularan su capacidad de

respuesta frente a las células tumorales. Así pues, se abordaron estas cuestiones por separado.

En la literatura ya había datos que demostraban que las células NK eran capaces de reconocer a las células uroteliales tumorales T24 y J82 (Brandau et al. 2001; Suttman et al. 2004; Higuchi et al. 2009). Sin embargo, dado que no se conocían las moléculas que podrían estar involucradas en este reconocimiento, se comenzó caracterizando la expresión de un gran número de moléculas, tanto activadoras como inhibidoras o de adhesión, en un amplio panel de líneas celulares de cáncer de vejiga de distintos grados de diferenciación. Este análisis reveló que todas las líneas celulares expresaban diferentes moléculas que podían contribuir a la activación o inhibición de las células NK. Se evaluó también su contribución en ensayos funcionales con células NK, recién purificadas y procedentes de líneas primarias activadas con IL-2, que se enfrentaban con las distintas líneas tumorales estudiadas. A diferencia de lo que ocurrió con las células NK recién purificadas, las cuales no respondieron frente a ninguna de las células diana, las células NK procedentes de líneas primarias activadas con IL-2 fueron capaces de responder frente a todas ellas en mayor o menor medida. El hecho de que haya o no respuesta por parte de las células NK depende del nivel de activación alcanzado tras la integración de todas las señales activadoras e inhibidoras que estas células reciben a través de sus múltiples receptores (Long et al. 2013). Así, los resultados observados sugieren que el reconocimiento de las moléculas expresadas por las diferentes células uroteliales sería suficiente para alcanzar el umbral de activación y consiguiente desgranulación en el caso de las células NK activadas con IL-2, pero no en el caso de las células NK recién purificadas. De esta forma, la activación basal que la IL-2 provoca en estas células NK estaría favoreciendo el hecho de que alcancen ese nivel umbral necesario para poder responder frente a las células tumorales. Sin embargo, la intensidad de esta respuesta no fue igual frente a las distintas líneas celulares: las células tumorales menos diferenciadas, T24, UM-UC-3 y J82, provocaban una mayor desgranulación que las células tumorales más diferenciadas, RT-112, RT4 y SW780.

En ensayos de citotoxicidad se comprobó que la muerte de las líneas celulares más diferenciadas era mayor en comparación con las líneas menos diferenciadas, a pesar de que la desgranulación frente a esas líneas era menor. Esto puede reflejar que las células NK no sólo pueden matar a las células diana mediante la liberación del contenido de sus gránulos líticos, sino también por otros mecanismos independientes de la liberación de perforinas y granzimas, tales como la interacción de FasL con Fas, o de TRAIL o TNF $\alpha$  con sus receptores (Zamai et al. 1998; Trapani and Smyth 2002). De hecho, se ha descrito que la línea T24 es susceptible a la lisis mediada por FasL-Fas, mientras que la línea J82 no (Brandau et al. 2000). Sin embargo, se sabe poco sobre la susceptibilidad de las líneas celulares RT4 y SW780 a la lisis mediada por las células NK. Adicionalmente, datos recientes sugieren que algunas células tumorales también podrían tener mecanismos de resistencia a la citotoxicidad, como los que tienen las propias células citotóxicas, mediante los cuales son capaces de relocalizar los lisosomas hacia la zona

de contacto con las células citotóxicas y liberar catepsinas que degraden las perforinas (Balaji et al. 2002; Khazen et al. 2016).

Dado que se observó mucha heterogeneidad en la expresión de ligandos que pueden modular la respuesta de las células NK en las distintas líneas celulares tumorales, se hicieron experimentos de bloqueo para investigar qué receptores de estas células citotóxicas, activadas con IL-2, desempeñaban un papel principal en el reconocimiento de las células tumorales. En estos experimentos se identificó al receptor activador NKG2D como uno de los receptores más importantes en el control de la activación tras el reconocimiento de las células tumorales de vejiga. A pesar de que, a primera vista, el nivel de expresión de los distintos ligandos varía entre unas células tumorales y otras, dificultando la asignación *a priori* del grado de respuesta que las células NK tendrían frente a ellas, no hay que olvidar que el reconocimiento y la respuesta de estas células citotóxicas depende de un equilibrio entre las señales inhibitoras y activadoras que reciben a través de sus múltiples receptores. Así, las líneas T24 y UM-UC-3, que expresan niveles más bajos de los ligandos de NKG2D, son capaces de estimular un nivel de desgranulación parecido al de la línea J82, pese a que ésta tiene niveles muy altos de estos ligandos. Sin embargo, la activación de las células NK frente a la línea J82 debe estar, en cierta medida, contrarrestada por los altos niveles de expresión de otros ligandos inhibidores, tales como las moléculas MHC-I.

| 121

Por otra parte, el hecho de que las células más diferenciadas expresaran E-cadherina, mientras que las menos diferenciadas no, indicaba que, tal vez, esta molécula podía estar teniendo un papel inhibitor en la activación de las células NK. A pesar de que la relación entre las cadherinas y el receptor inhibitor KLRG1 aún es objeto de estudio, está claro que es capaz de modular la respuesta tanto de células NK como de células T (Ito et al. 2006; Tessmer et al. 2007; Banh et al. 2009). Sin embargo, el bloqueo de KLRG1 en las células NK no produjo cambios consistentes en la respuesta de estas células frente a las células tumorales uroteliales que expresaban E-cadherina.

Por su parte, el bloqueo de otros receptores activadores como NKp46 no produjo una gran disminución en la desgranulación de las células NK en respuesta a las distintas células tumorales. Sin embargo, cuando se bloqueaban NKG2D y NKp46 simultáneamente, la desgranulación por parte de estas células disminuía drásticamente, certificando una vez más la importancia de la sinergia entre los distintos receptores activadores en la activación y respuesta de las células NK (Bryceson et al. 2006).

En cuanto a otros receptores que participan en la activación de las células NK, a pesar de que todas las líneas expresaban niveles bajos de los ligandos de NKp30 y que las líneas RT-112 y SW780 tenían niveles más altos de CD155 que el resto, el bloqueo de NKp30 y DNAM-1 no produjo un descenso mayor de la desgranulación de las células NK en respuesta a ninguna

línea tumoral cuando se bloqueaban junto con NKG2D, por lo que parece que estos receptores no desempeñan un papel muy importante en este sistema.

Por último, pese a que las moléculas MHC-I tienen un papel inhibidor en la respuesta de las células NK, que cuentan con diversos receptores inhibidores que las reconocen, su bloqueo en las células uroteliales no tuvo un efecto muy llamativo en la respuesta de las células citotóxicas. Tras el bloqueo de estas moléculas, las células que expresaban niveles más altos, como por ejemplo la línea J82, parecen inducir una respuesta ligeramente más eficiente por parte de las células NK. Sin embargo, el patrón de desgranulación frente a las distintas líneas celulares se mantiene, sugiriendo, por una parte, que la susceptibilidad de las células tumorales uroteliales a las células NK es independiente del donante y, por otra, que el reconocimiento de estas células es independiente de la activación mediada por la pérdida de lo propio (hipótesis del “missing-self”).

Una vez conocida la capacidad de respuesta de las células NK activadas con IL-2, así como los receptores que desempeñan un papel principal en la desgranulación y citotoxicidad cuando estas células citotóxicas se enfrentan a las distintas líneas celulares de cáncer de vejiga, el siguiente objetivo fue comprobar si la exposición a BCG producía cambios en estas células tumorales de vejiga que afectasen a su reconocimiento por parte de las células NK.

122 | Como existían datos previos en la literatura que mostraban que, tras la exposición a *Mycobacterium tuberculosis*, se producía un aumento en los niveles de expresión de los ligandos de NKG2D en monocitos (Vankayalapati et al. 2005), y también que, tras la estimulación con BCG, se producía un aumento, aunque en este caso a nivel de ARNm, de algunos de estos ligandos en las líneas T24 y RT-112 (Miyazaki et al. 2011), se decidió comprobar si los niveles de expresión en superficie de estas moléculas cambiaban en las distintas células tumorales en respuesta a BCG. Sin embargo, los datos presentados en esta tesis muestran que la estimulación con BCG de las distintas líneas tumorales no produce cambios ni en los ligandos de NKG2D, ni en la molécula HLA-C. Estos resultados se vieron confirmados en ensayos funcionales, en los que las células NK activadas con IL-2 no aumentaban el nivel de desgranulación tras la exposición a las células tumorales que habían sido previamente estimuladas con BCG.

Así, una vez rechazada la primera parte de la hipótesis, al comprobar que la micobacteria no afectaba a las células tumorales de vejiga mejorando el reconocimiento por parte de las células NK, se pasó a comprobar la segunda parte: si BCG no estaba produciendo cambios en las células tumorales, podría estar produciéndolos en las células NK de tal forma que se favoreciese la respuesta frente a las células tumorales uroteliales. Sin embargo, la estimulación con BCG no sólo no fue capaz de provocar una mayor activación y respuesta frente a las células tumorales uroteliales por parte de células NK que estaban previamente activadas con IL-2,

sino que tampoco fue suficiente para producir la activación y respuesta por parte de células NK recién purificadas.

En conjunto, estos datos demostraron que, si bien las células NK recién aisladas no eran capaces de responder frente a las células tumorales uroteliales, una vez activadas en IL-2, estas células citotóxicas eran capaces de reconocer y responder induciendo la muerte de las células diana. Sin embargo, la estimulación con BCG, tanto de las células tumorales uroteliales como de las células NK aisladas, no producía cambios en el reconocimiento de las células tumorales uroteliales por estas células citotóxicas.

Ya que había suficientes datos en la literatura que apoyaban el importante papel de las células NK en la buena respuesta al tratamiento con BCG (Brandau et al. 2001), y dado que también se habían publicado varios estudios que demostraban que distintas poblaciones celulares, presentes tanto en sangre periférica como en la vejiga, eran capaces de responder a BCG (revisado en (Redelman-Sidi et al. 2014)), se planteó una nueva hipótesis: la importancia del tratamiento con BCG en la respuesta de las células NK podría residir en los eventos intermedios que llevaban al reclutamiento a la vejiga y a la activación de estas células citotóxicas, en los que otras células del sistema inmunitario se verían implicadas.

Datos publicados previamente describían que, tras la estimulación *in vitro* de PBMCs con BCG, se generaba una población de células citotóxicas que inicialmente se denominaron células BAK (Thanhäuser et al. 1993; Böhle et al. 1993; Böhle et al. 1994), y que, posteriormente se comprobó que estaba compuesta, principalmente, por células NK activadas por acción de BCG (Brandau et al. 2001). Curiosamente, ya se había descrito que para la generación de las células BAK era necesaria la presencia de monocitos y células T CD4<sup>+</sup> que produjeran una respuesta tipo Th1 (Thanhäuser et al. 1995). En cierta medida, esto podría explicar por qué la estimulación con BCG de las células NK purificadas no había tenido efecto alguno en la activación y respuesta de estas células frente a las células tumorales. Sin embargo, la caracterización de estas células BAK, así como su capacidad para responder frente a las células de cáncer de vejiga, apenas se había explorado. Por ese motivo, se continuó el trabajo profundizando en el estudio del efecto que la micobacteria tenía sobre las células NK en el contexto del total de células mononucleares de sangre periférica.

Sin duda, el aumento de la proporción de células NK que expresaba niveles elevados de CD56 tras la estimulación de las PBMCs con BCG fue el resultado más llamativo. En periferia, las células NK CD56<sup>bright</sup> constituyen una población minoritaria en el total de las células NK y se caracterizan por responder a la estimulación con citoquinas y tener una capacidad secretora alta, mientras que su actividad citotóxica es relativamente baja. De hecho, la citotoxicidad,



mediada por granzimas y perforinas, se asocia normalmente con la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> (Cooper 2001; Jacobs et al. 2001; Poli et al. 2009). Sorprendentemente, esta nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup>, que se generaba en respuesta a BCG, era capaz de responder de manera eficiente frente a las células tumorales uroteliales mediante la liberación del contenido de sus gránulos líticos. Además, también era diferente fenotípicamente, ya que expresaba marcadores de superficie que normalmente no se encuentran en esta subpoblación celular. Y, por último, para que se generase no era necesario el contacto directo ni con la bacteria ni con otras poblaciones celulares, lo que sugería la participación de factores solubles.

Los experimentos de separación celular demostraron que una gran parte de la nueva población CD56<sup>bright</sup>, generada en respuesta a BCG, estaba formada por células NK CD56<sup>dim</sup> con una intensidad de fluorescencia para CD56 aumentada tras los 7 días de co-cultivo. Estos datos explicarían el hecho de que la población de células NK CD56<sup>bright</sup> presentara esa gran capacidad citotóxica frente a las células tumorales uroteliales y expresara moléculas típicas de la subpoblación CD56<sup>dim</sup>, tales como CD16, KIR y CD57 (Jacobs et al. 2001; Cooper et al. 2001). Sin embargo, la expresión de CD16 y KIR en la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> no se debe sólo a la subpoblación CD56<sup>dim</sup> inicial, sino que, también, una parte de la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> inicial es capaz de expresar niveles bajos de estos dos receptores.

124 | El aumento en los niveles de expresión de CD56 en la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> ayuda a responder ciertas cuestiones, tales como el aumento en citotoxicidad y los cambios fenotípicos en la población CD56<sup>bright</sup> después de los 7 días de estimulación con BCG, pero también plantea cuestiones nuevas, como por ejemplo qué origen y qué papel tiene ese aumento en CD56. El modelo aceptado hoy en día postula que, durante la maduración de las células NK, la subpoblación CD56<sup>bright</sup> constituye un estadio de maduración anterior al de la subpoblación CD56<sup>dim</sup>. De esta forma, la población “inmadura” de células NK CD56<sup>bright</sup>, cuya función es la secreción de citoquinas, presenta niveles de expresión de CD56 elevados. Sin embargo, con la maduración, su capacidad secretora disminuye al tiempo que adquiere una función citotóxica, la cual da nombre a la población de células NK, *Natural Killer*, y que va asociada con la disminución en los niveles de expresión de la molécula CD56 (Yu et al. 2013). En los resultados presentados en esta tesis, el aumento en los niveles de expresión de CD56 parece ir en contra del modelo de maduración propuesto. Pero, curiosamente, el aumento en la expresión de CD56 ya se ha observado en más de una ocasión: de manera frecuente durante el mantenimiento *in vitro* de las líneas primarias de células NK con varias citoquinas, como IL-2, IL-12 o IL-18, así como tras la estimulación con otras moléculas, como 4-1BBL (Fehniger et al. 1999; Takahashi et al. 2007; Dowell et al. 2012; Ardolino et al. 2014).

CD56 es NCAM1 (del inglés “*Neural Cell Adhesion Molecule 1*”), es decir, un miembro de la familia de moléculas de adhesión de células neuronales, cuya expresión ha demostrado ser importante en el desarrollo embrionario del sistema nervioso (Edelman 1986). En el sistema



hematopoyético, solamente las células NK y un pequeño porcentaje de células T expresan CD56 (Lanier et al. 1989), aunque su expresión parece no aportar nada a la función citotóxica de estas células. Como esta molécula ha demostrado ser importante en la adhesión homofílica en tejido neuronal, Lanier y sus colaboradores estudiaron el papel de CD56 en la adhesión de las células NK a distintos tipos celulares, que también expresaban o no CD56, sin observar diferencias significativas en la respuesta de estas células citotóxicas frente a cada tipo celular en ambas condiciones (Lanier et al. 1991). Puesto que CD56 es una molécula de adhesión, otra posible función estaría relacionada con la migración. Si así fuera, el hecho de que haya dos subpoblaciones con distintos niveles de expresión de esta molécula también permitiría explicar, junto con la expresión diferencial de los diferentes receptores de quimioquinas, el hecho de que la distribución de las dos subpoblaciones de células NK en el organismo sea diferente. A pesar de que esto sería difícil de comprobar en humano, determinar la función que CD56 tiene en estas células sería muy interesante para comprender, en último término, a qué se debe que haya esos dos niveles de expresión.

Una vez visto que en los ensayos con células NK purificadas, éstas sólo eran capaces de responder frente a las células tumorales de vejiga cuando estaban, en cierta medida, activadas, y ya que la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> era capaz de desgranular de manera eficiente en respuesta a las células tumorales uroteliales, se estudió si, en estas condiciones, las células también tenían un cierto nivel de activación. El nivel de activación de estas células se midió mediante el análisis en ambas subpoblaciones de células NK, a lo largo de la semana de co-incubación con la micobacteria, de la intensidad de fluorescencia del marcador de activación temprano CD69, cuya expresión aumentaba durante los primeros días y luego disminuía, y del marcador de activación tardío CD25, que efectivamente aumentaba en los últimos días de cultivo. CD25 es la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2 (IL-2R $\alpha$ ) que, por sí sólo es capaz de unir IL-2 con baja afinidad, y cuando se asocia con la cadena  $\beta$  (CD122) y con la cadena  $\gamma$  común ( $\gamma$ c, CD132), constituye el receptor de alta afinidad de IL-2 (Boyman and Sprent 2012). A pesar de que el análisis de los factores solubles en los cultivos *in vitro* reveló la presencia de IL-2 a niveles muy parecidos, tanto en los cultivos estimulados con BCG como en los cultivos sin estimular, el hecho de que aumente CD25 en la población de células NK con niveles altos de CD56 a partir del día 4-5 de incubación con BCG se podría relacionar con la elevada tasa de proliferación que esta población presenta a partir de ese mismo tiempo en cultivo con la micobacteria.

Curiosamente, el aumento en la capacidad de desgranular de esta nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> en respuesta a las células tumorales va acompañado de un aumento en el contenido de perforina y granzima B de sus gránulos líticos. En condiciones normales, los niveles de perforina y granzima se encuentran más elevados en la subpoblación de células NK

CD56<sup>dim</sup> que en la CD56<sup>bright</sup> (Jacobs et al. 2001; Batoni et al. 2005). Sin embargo, tras la semana en cultivo, las células NK del cultivo sin estimular pierden gran parte del contenido de perforina y granzima B de sus gránulos líticos, mientras que las células NK del cultivo estimulado con BCG mantienen aumentados los niveles de expresión de estas moléculas. Además, el nivel de expresión de ambas moléculas es incluso mayor en la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> que en la CD56<sup>dim</sup>, lo cual se podría explicar también por el hecho de que una parte mayoritaria de la nueva población CD56<sup>bright</sup> ha derivado de la subpoblación CD56<sup>dim</sup> inicial.

En cuanto a los receptores implicados en el reconocimiento y la respuesta citotóxica de la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> frente a las células tumorales de vejiga, el receptor NKG2D parece mantener un papel importante aunque es más obvio que hay otros receptores implicados, si se compara con el papel predominante que desempeñaba en el reconocimiento de estas mismas células por parte de las células NK cultivadas en IL-2. El hecho de que no haya diferencias en el nivel de expresión de este receptor por efecto de la estimulación con la micobacteria indica que es posible que otros receptores estén ganando importancia en el reconocimiento de las células tumorales.

Otro receptor implicado en la respuesta de las células NK es el receptor de baja afinidad de porción Fc de las IgG, CD16, el cual media la respuesta de tipo ADCC (Dall'Ozzo et al. 2004; Battella et al. 2016). Puesto que la expresión de este receptor aumenta en la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> tras la exposición del total de PBMCs a BCG, se comprobó que ese aumento iba asociado con un aumento en la capacidad de esta población para llevar a cabo ADCC. Este dato nos confirma las variaciones en la capacidad citotóxica que la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> ha adquirido en respuesta a la estimulación con BCG. Como se desconoce si, durante el tratamiento de los pacientes con BCG, las células B desempeñan un papel importante que pueda involucrar la producción de anticuerpos, ésta podría ser una nueva línea de trabajo que sería interesante explorar.

Por último, otro resultado llamativo relacionado con el aumento de la citotoxicidad, es que va asociado a la pérdida de capacidad de estas células NK CD56<sup>bright</sup> para producir IFN $\gamma$  en respuesta a las células tumorales uroteliales tras 7 días en cultivo. Por una parte, estudios publicados previamente demostraban que la estimulación con BCG inducía la producción y liberación de IFN $\gamma$  por parte de las células NK en ausencia de células diana, alcanzando su máximo tras 24 horas de incubación (Esin et al. 2004; Batoni et al. 2005). Esto tiene sentido ya que las células NK CD56<sup>bright</sup> son capaces de responder a citoquinas, pudiendo secretar IFN $\gamma$  sin necesidad de enfrentarse a células diana (Fehniger et al. 1999). Sin embargo, en las condiciones estudiadas en esta tesis, la detección de IFN $\gamma$  en el cultivo se produce a partir del tercer día de co-incubación con la micobacteria. Por otra parte, en cuanto a la capacidad de estas células NK para producir IFN $\gamma$  en respuesta a las células tumorales uroteliales, los ensayos funcionales han mostrado que, tras la estimulación del total de PBMCs con BCG, las células NK siguen una cinética de producción de IFN $\gamma$  según la cual, a tiempos cortos de estimulación con la

micobacteria (3 días), la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> son capaces de producir más IFN $\gamma$  en respuesta a estas células tumorales. Sin embargo, a tiempos más largos de estimulación con BCG (7 días), la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> pierde completamente la capacidad de responder frente a las células tumorales de vejiga mediante la producción de IFN $\gamma$ . Esto se puede explicar también por el hecho de que la nueva población de células NK CD56<sup>bright</sup> generada tras 7 días de estimulación con BCG está formada, principalmente, por células NK que inicialmente eran CD56<sup>dim</sup> y que aumentaron la expresión de CD56 en su superficie. Así, se puede explicar el aumento de la citotoxicidad en la nueva subpoblación CD56<sup>bright</sup>, y su muy limitada capacidad para responder frente a estas células mediante la producción de IFN $\gamma$ .

Otra observación interesante, que no se ha seguido explorando más a fondo, es que los monocitos adheridos a la placa desaparecen tras la incubación de las células mononucleares de sangre periférica con BCG. Este hecho da cierta idea de que otras poblaciones celulares pueden estar contribuyendo a aportar factores importantes para la activación de las células NK en respuesta a la micobacteria. A pesar de que en la literatura existe cierta controversia en cuanto a lo que les ocurre a los monocitos en respuesta a BCG (Kremer et al. 1997; Haoues et al. 2014), se ha establecido que la exposición a *Mycobacterium tuberculosis* induce la apoptosis de monocitos y macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo* (Gercken et al. 1994; Bocchino et al. 2005). Si bien cabía la posibilidad de que los monocitos se estuvieran diferenciando a otras poblaciones celulares no adherentes, como pueden ser las células dendríticas, datos del laboratorio apuntan a que, en este sistema, una buena parte de estas células está entrando en apoptosis tras la exposición a BCG. Sin embargo, ya que se ha descrito que la estimulación de macrófagos con BCG favorece la producción de citoquinas tales como IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  (Wang et al. 1999; Atkinson et al. 2000), es posible que alguna subpoblación mielóide o bien estas mismas células antes de entrar en apoptosis, sean capaces de iniciar una respuesta humoral que, en último término, va a dar lugar a la activación y diferenciación de las células NK.

El análisis de los factores solubles en los co-cultivos *in vitro* de PBMCs y BCG reveló la producción de una gran variedad de citoquinas y quimioquinas, normalmente producidas por células mieloides y células de la inmunidad innata. Así, se detectaron cantidades elevadas y constantes de factores solubles activadores procedentes de células innatas en los cultivos estimulados con BCG, como TNF $\alpha$ , mientras que otros factores solubles mostraban distintos patrones de acumulación o desaparición en los cultivos. De esta forma, se detectaron monoquinas que aumentaban su concentración a lo largo de la semana, tales como RANTES, MIP-1 $\beta$  o IP-10, o que la disminuían tras un pulso inicial, como IL-10 o IL-1 $\beta$ . Esta distribución temporal en la detección de algunos de los factores solubles estudiados hace pensar que, tal vez, se pueden estar produciendo varios momentos de activación de las células en el cultivo a consecuencia de diferentes oleadas de citoquinas. Por otra parte, la presencia de IL-2, tanto en los cultivos estimulados con BCG como en los no estimulados, apunta a que hay una activación

general en el cultivo, en el que probablemente las células T o NK pueden estar produciendo inicialmente esta citoquina, favoreciendo así su mantenimiento.

En paralelo a los ensayos *in vitro*, se realizó un estudio con muestras obtenidas de pacientes. La mayoría de los estudios en pacientes publicados hasta el momento analizan la respuesta inflamatoria inicial tras el tratamiento con BCG, ya que las muestras se recogen después de pocas horas y hasta 2 días tras la instilación de la micobacteria en la vejiga de los pacientes (revisado en (Zuiverloon et al. 2012)). Sin embargo, el estudio en pacientes planteado en esta tesis presta más atención, no tanto a la respuesta inflamatoria inicial, sino más bien a qué parte de la respuesta inmunitaria se mantiene en el tiempo y, de manera más específica, al papel que las células NK tienen en la buena respuesta al tratamiento. Para ello, se seleccionó una pequeña cohorte de pacientes de cáncer de vejiga tratados con BCG de los que se recogieron muestras a distintos puntos a lo largo del tratamiento. Como control, se consideró la opción de estudiar una cohorte de pacientes sanos pero, ya que es posible que en los pacientes con cáncer haya alteraciones en el sistema inmunitario, finalmente se optó por estudiar una cohorte de pacientes con cáncer de vejiga pero cuyo tratamiento, en principio, no alterase la respuesta inmunológica, como es el caso de la MMC. Además, la forma de administración de este tratamiento es igual que la de BCG: por instilaciones intravesicales.

128 |

Este estudio incluyó el análisis de muestras de sangre y orina de los pacientes. En las muestras de sangre, por una parte, se analizó un número elevado de marcadores de población, función y activación y, por otra, se estudió la capacidad funcional de las PBMCs de estos pacientes. En las muestras de orina, se analizaron los factores solubles involucrados en la respuesta al tratamiento a nivel local.

Los objetivos finales eran, por una parte, validar el modelo *in vitro* y, por otra, seleccionar un grupo de marcadores, ya fuera a nivel local (en la orina) o periférico (en sangre) que permitiese la realización de otro estudio posterior, más dirigido y en una cohorte de pacientes mayor.

A nivel periférico, algunos de los parámetros mostraron diferencias muy moderadas a consecuencia del tratamiento con BCG. Así, el porcentaje de células NK totales en sangre periférica se mantenía en cada paciente a lo largo del tratamiento con la micobacteria. Sin embargo, es interesante resaltar que existen diferencias en el porcentaje de células NK entre los distintos pacientes. Esta observación está de acuerdo con datos recientes que demuestran la existencia de una gran heterogeneidad en la población de células NK entre distintos individuos e, incluso, entre gemelos univitelinos (Horowitz et al. 2013). Por su parte, también es llamativo el hecho de que, si bien la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> apenas alcanza el 5% del total de células NK en condiciones normales, 6 de los 10 pacientes del grupo tratado con BCG tienen

al menos un punto por encima de este valor. En cambio, en el grupo de pacientes tratados con MMC, el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> se encuentra en el rango normal, es decir, por debajo del 5%. Obviamente, sería necesario estudiar este parámetro en un mayor número de pacientes para comprobar su posible valor predictivo.

Por otra parte, el hecho de que los niveles de expresión del receptor NKG2D en las células NK de los pacientes disminuya tras los primeros ciclos de tratamiento a nivel periférico, está en consonancia con la importancia que tiene este receptor en el reconocimiento de las células tumorales uroteliales y que ya se había visto en los ensayos *in vitro*. A pesar de que es muy difícil extraer conclusiones de lo que está ocurriendo en la vejiga de los pacientes tratados con la micobacteria a partir de observaciones a nivel periférico, pero dado que se ha descrito que tras la interacción de NKG2D con sus ligandos se produce la internalización de este receptor (Shafi et al. 2011), este resultado podría indicar que se ha producido la interacción entre las células NK y los ligandos de su receptor posiblemente en la vejiga de estos pacientes. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, para poder extraer este tipo de conclusiones sería necesario analizar este parámetro en una cohorte mayor de pacientes.

Finalmente, se comprobó *in vitro* que la estimulación con BCG de las PBMCs de dos de los pacientes que respondieron favorablemente al tratamiento también producía la expansión de la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup>. Dado que las PBMCs de los pacientes también son capaces de responder a la micobacteria, no se descarta la idea de que la expansión de esta nueva subpoblación de células NK también se pueda estar produciendo a nivel local en la vejiga aunque, evidentemente, sería necesario confirmarlo. Sin embargo, esto sería complicado ya que no se toman biopsias de control durante el tratamiento a no ser que se sospeche que pueda haber recurrencia del tumor.

Como ya se ha mencionado, los resultados observados a nivel celular en sangre periférica podrían tener poco que ver con la respuesta a la micobacteria que se está produciendo a nivel local en la vejiga. Si bien algunas de las células que respondieron a BCG en la vejiga podrían estar saliendo de nuevo a circulación, el efecto de dilución en el total de células del torrente sanguíneo sería muy grande. De esta forma es muy difícil determinar, a partir de los resultados obtenidos a nivel periférico, qué está ocurriendo en la vejiga. Con el fin de poder estudiar la respuesta de las células NK a la micobacteria a nivel local, nuestro grupo está intentando poner a punto el análisis por citometría de flujo de las poblaciones celulares que se liberan en la orina de los pacientes.

Al margen del análisis a nivel celular, el análisis de los factores solubles en las muestras de orina de los pacientes reveló resultados muy interesantes y que, en cierta medida, sirven para validar el modelo *in vitro*. En estudios publicados previamente, en los que se analizaba el contenido de factores solubles en la orina de los pacientes a tiempos cortos tras la instilación

de BCG, se había detectado la presencia de citoquinas tales como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 o TNF $\alpha$  (Bisiaux et al. 2009). Estas citoquinas también se detectaron en los ensayos *in vitro* durante los primeros días de co-incubación de las PBMCs con la micobacteria. Por su parte, el análisis de los factores solubles en la orina de los pacientes incluidos en el estudio presentado en esta tesis, permite evaluar lo que ocurre a tiempos más largos tras la estimulación con la micobacteria, ya que las muestras se recogieron después de una semana o 3 meses desde la última instilación. Así, se comprobó que otras citoquinas tales como IL-22, IL-23 o IP-10, al igual que en el día 7 de los ensayos *in vitro*, se encontraban en concentraciones elevadas en la orina de estos pacientes 7 días después de la última instilación. De nuevo, el hecho de que a diferentes tiempos se detecten distintos factores solubles en la orina de los pacientes tratados con BCG, apoyaría la idea de que, también a nivel local, se están produciendo distintos momentos de activación que dan lugar a distintas oleadas de factores solubles en respuesta a la micobacteria. Así, los factores solubles detectados a tiempos cortos tras la instilación favorecerían el reclutamiento de nuevas poblaciones celulares que, bien por contacto con la micobacteria o simplemente por encontrarse en ese entorno pro-inflamatorio, producirían una nueva oleada de factores solubles implicados tanto en el reclutamiento como en la activación de nuevas poblaciones celulares y, entre ellas, células citotóxicas.

130 | Por su parte, es muy llamativo el hecho de que IP-10 se encuentre específicamente en la orina de los pacientes que han sido tratados con BCG tras 7 días desde de la última instilación y que no se encuentre, precisamente, en la orina del paciente que no respondió al tratamiento en la cohorte estudiada. Sin embargo, en los ensayos *in vitro*, a pesar de que se produce IP-10 en ambas condiciones, tanto en los cultivos estimulados con BCG como en los cultivos sin estimular, se produce un retraso en el aumento de la concentración de esta quimioquina en presencia de BCG. Ya que se ha descrito que la IL-10 bloquea la producción de IP-10 (Tebo et al. 1998), la alta concentración de IL-10 en los primeros días en los cultivos estimulados con BCG explicaría ese retraso en la producción y acumulación de IP-10. Curiosamente, en los ensayos *in vitro* también se ha detectado un aumento de la expresión del receptor de esta quimioquina, CXCR3, en ambas subpoblaciones de células NK, así como en células T CD3<sup>+</sup>, en respuesta a BCG, sugiriendo que IP-10 podría ser importante en el reclutamiento y, sobre todo, el mantenimiento de estas células en la vejiga en respuesta al tratamiento. Si bien es cierto que no se detectó IL-10 tras 7 días desde la última instilación en la orina de los pacientes, esta citoquina tampoco se detectaba en los ensayos *in vitro* tras ese mismo tiempo de incubación. Además, la IL-10 está relacionada con la respuesta Th2, y se ha asociado con mala respuesta al tratamiento, tanto *in vitro* como *in vivo* (Riemensberger et al. 2002; Luo et al. 2003; Luo et al. 2010). El estudio de la concentración de IP-10, IL-10 y otros factores solubles, en un grupo de pacientes más grande, así como su análisis a tiempos más cortos, a días 1, 4 y 7 tras la instilación, está siendo objeto de un nuevo estudio para el que nuestro grupo está empezando

a recoger muestras, de nuevo en colaboración con el grupo de los Drs. Luis Martínez-Piñeiro, del Hospital Infanta Sofía (San Sebastián de los Reyes, Madrid), y Mario Álvarez Maestro, del Hospital Universitario La Paz (Madrid).

En conjunto, los resultados obtenidos en esta tesis han servido para proponer un modelo según el cual la instilación de BCG en la vejiga de los pacientes puede estar produciendo la activación y respuesta de células mieloides presentes ya en la vejiga, así como el reclutamiento y la respuesta de otras células mieloides, que iniciarán una respuesta humoral. Esta respuesta humoral estará mediada por quimioquinas, entre ellas IP-10, producida en respuesta a IFN $\gamma$ , cuya función será atraer a otras células del sistema inmunitario a la vejiga, y también por citoquinas tales como IL-12 o IL-18, que activarán a las células citotóxicas, entre ellas a las células NK. Además, en este entorno activador, se estimulará también la producción de otras citoquinas como IL-2 por parte de las células T y NK. En estas condiciones, y al igual que se ha visto *in vitro*, la activación de las células NK podría estar favoreciendo su diferenciación hacia una población con niveles elevados de CD56 y con gran capacidad citotóxica frente a las células tumorales de cáncer de vejiga, favoreciendo así la eliminación del tumor.

Asimismo, los resultados obtenidos en esta tesis también han dado lugar a la organización de un nuevo estudio en pacientes, en este caso analizando de una manera más dirigida ciertos aspectos de la respuesta inmunitaria al tratamiento, tales como el análisis de las citoquinas y quimioquinas que se liberan en respuesta a BCG a distintos puntos de tiempo tras la instilación, y que podrían servir como biomarcadores de respuesta al tratamiento.

# CONCLUSIONES



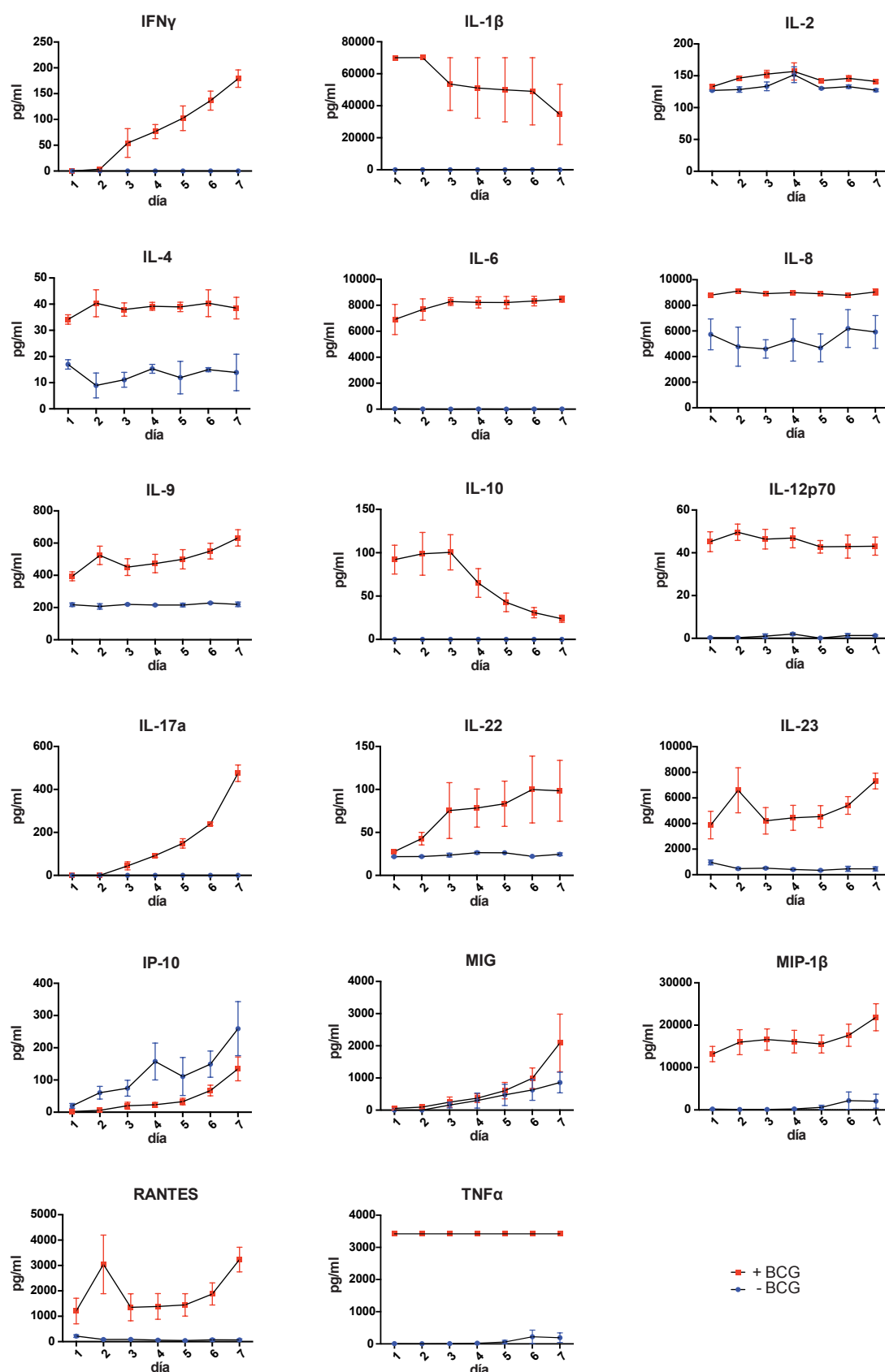
1. Las líneas celulares de cáncer de vejiga estudiadas expresan un amplio panel de moléculas en su superficie que pueden modular la respuesta de las células NK. La expresión de estas moléculas no se ve alterada por la estimulación con BCG.
2. Mientras que las células NK recién purificadas no son capaces de reconocer a ninguna de las líneas tumorales uroteliales, una vez activadas con IL-2, pueden reconocerlas y responder mediante la producción de IFN $\gamma$  y la liberación de sus gránulos líticos, induciendo la muerte de la diana. Esta respuesta se produce principalmente a través de los receptores NKG2D y NKp46 y no se ve afectada por la estimulación de las células tumorales con BCG.
3. La capacidad de las células NK aisladas para reconocer y responder frente a las células tumorales uroteliales no cambia tras su exposición a BCG, y esto ocurre tanto en células NK recién purificadas como en líneas primarias cultivadas con IL-2.
4. La estimulación con BCG de las células NK, en el contexto del total de PBMCs, provoca la expansión de una subpoblación CD56<sup>bright</sup> que, inesperadamente, expresa CD16, KIR y CD57.
5. La subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> generada en respuesta a BCG tiene, a tiempos cortos, gran capacidad de producir IFN $\gamma$  en respuesta a las células tumorales de vejiga, mientras que a tiempos más largos pierde esa capacidad secretora y adquiere, sorprendentemente, una gran capacidad citotóxica.
6. La nueva subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> se genera en respuesta a factores solubles liberados al medio durante la co-incubación de las células de sangre periférica con BCG.
7. La adquisición de nuevas moléculas de superficie así como la capacidad citotóxica de la nueva subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup> se explica porque ésta se origina, principalmente, a partir de células de la subpoblación NK CD56<sup>dim</sup> inicial que aumentan el nivel de expresión de CD56.
8. En los pacientes tratados con BCG, los cambios a nivel periférico fueron más modestos que los que se podrían detectar a nivel local y, por tanto, las células NK circulantes muestran solamente ligeros cambios a consecuencia del tratamiento.

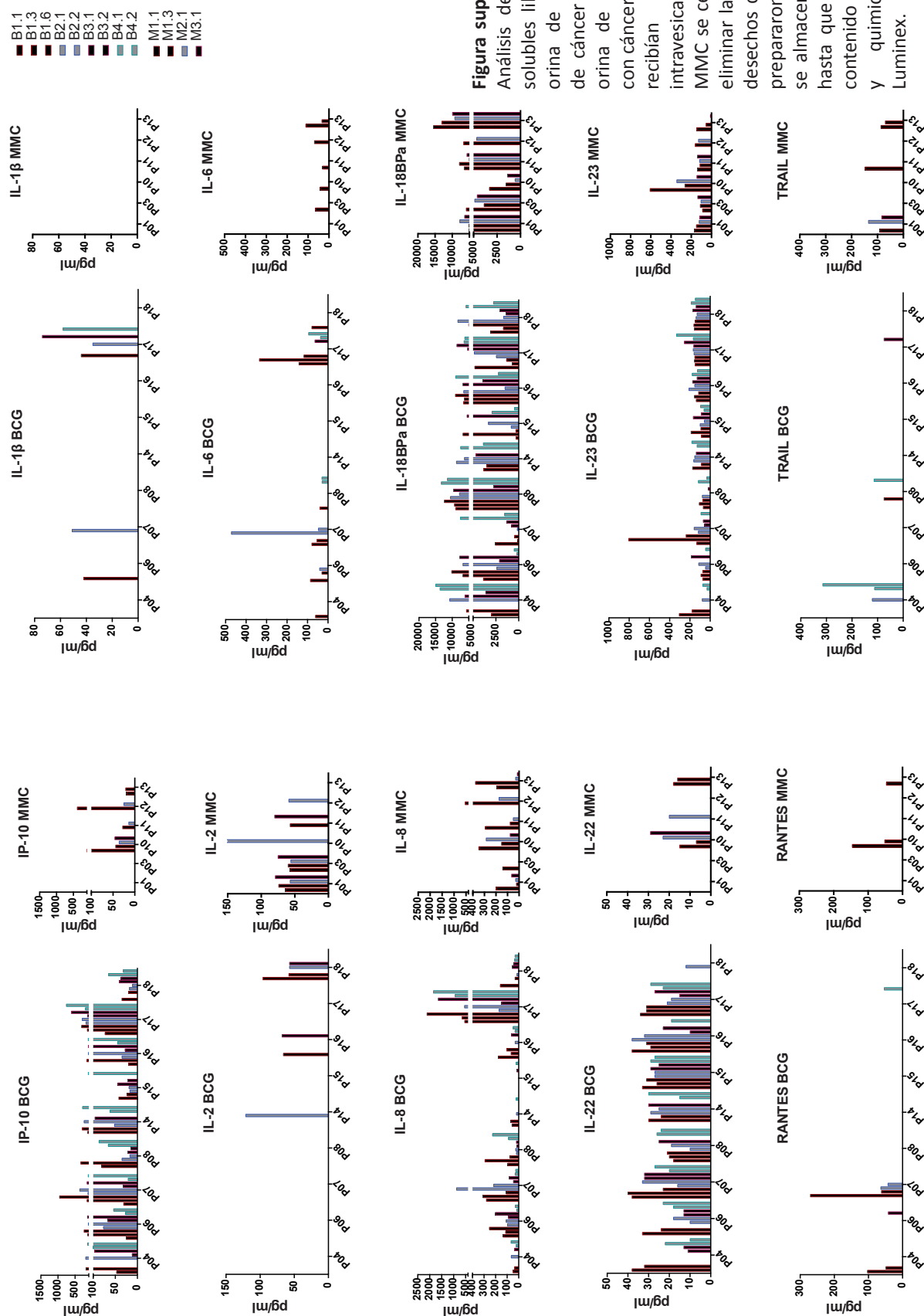
9. En la orina de los pacientes se detectan, tras 7 días desde la instilación con BCG, factores solubles relacionados con la respuesta inmunitaria innata. Estas moléculas, cuya liberación se puede explicar como una consecuencia de los factores observados los primeros días, tanto en pacientes como *in vitro*, permite la validación de este modelo.
10. La presencia de IP-10 en la orina de los pacientes respondedores al tratamiento con BCG sugiere que la medida de esta quimioquina podría utilizarse como método de predicción de respuesta de los pacientes al tratamiento con BCG.

**ANEXOS**

# ANEXO I

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS





## ANEXO II

### ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

Durante la realización de esta tesis doctoral he participado en diferentes proyectos que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

#### Artículos relacionados con la tesis doctoral:

**E. M. García-Cuesta**, S. López-Cobo, M. Álvarez-Maestro, G. Esteso, G. Romera-Cárdenas, M. Rey, R. L. Cassady-Cain, A. Linares, A. Valés-Gómez, H. T. Reyburn, L. Martínez-Piñeiro, and M. Valés-Gómez, "NKG2D is a Key Receptor for Recognition of Bladder Cancer Cells by IL-2-Activated NK Cells and BCG Promotes NK Cell Activation.," *Front. Immunol.*, vol. 6, p. 284, Jan. 2015.

#### Otros artículos:

S. López-Cobo, G. Romera-Cárdenas, **E. M. García-Cuesta**, H. T. Reyburn, and M. Valés-Gómez, "Transfer of the human NKG2D ligands UL16 binding proteins (ULBP) 1-3 is related to lytic granule release and leads to ligand retransfer and killing of ULBP-recipient natural killer cells.," *Immunology*, vol. 146, no. 1, pp. 70–80, Sep. 2015.

G. Romera-Cárdenas, L. M. Thomas, S. Lopez-Cobo, **E. M. García-Cuesta**, E. O. Long, and H. T. Reyburn, "Ionomycin Treatment Renders NK Cells Hyporesponsive.," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, p. e0150998, Jan. 2016.

M. Valés-Gómez, G. Esteso, C. Aydogmus, A. Blázquez-Moreno, A. V Marín, A. C. Briones, B. Garcillán, **E. M. García-Cuesta**, S. López Cobo, S. Haskologlu, M. Moraru, F. Cipe, K. Dobbs, F. Dogu, S. Parolini, L. D. Notarangelo, C. Vilches, M. J. Recio, J. R. Regueiro, A. Ikinciogullari, and H. T. Reyburn, "Natural killer cell hyporesponsiveness and impaired development in a CD247-deficient patient.," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 137, no. 3, pp. 942–945.e4, Mar. 2016.



**ANEXO III**

**PATENTE**

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis doctoral han dado lugar a la solicitud de una patente:

*"METHOD FOR PREDICTING THE THERAPEUTIC RESPONSE TO BCG ANTICANCER TREATMENT IN BLADDER CANCER"*. Número de solicitud: 201531936. A nombre de: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) (65%), The National Institute For Biological Standards And Control (NIBSC) (15%) y el Hospital Universitario Infanta Sofía (20%). País: España. Fecha: 2015.

# **BIBLIOGRAFÍA**

**A**

- Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA, James K (1999) BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. *Lancet* (London, England) 353:1689–94. doi: 10.1016/S0140-6736(98)07422-4
- Allavena P, Sica A, Solinas G, et al (2008) The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol* 66:1–9. doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.07.004
- Ardolino M, Azimi CS, Iannello A, et al (2014) Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. *J Clin Invest* 124:4781–4794. doi: 10.1172/JCI74337
- Arnon TI, Lev M, Katz G, et al (2001) Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31:2680–9. doi: 10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::AID-IMMU2680>3.0.CO;2-A
- Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, et al (2013) A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA\*008. *Biochem J* 454:295–302. doi: 10.1042/BJ20130194
- Atkinson S, Valadas E, Smith SM, et al (2000) Monocyte-derived macrophage cytokine responses induced by *M. bovis* BCG. *Tuber Lung Dis* 80:197–207. doi: 10.1054/tuld.2000.0247

**B**

- Babjuk M, Burger M, Zigeuner R, et al (2013) EAU guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: update 2013. *Eur Urol* 64:639–53. doi: 10.1016/j.eururo.2013.06.003
- Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, et al (2002) Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med* 196:493–503.
- Balkwill F, Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539–45. doi: 10.1016/S0140-6736(00)04046-0
- Banh C, Fugère C, Brossay L (2009) Immunoregulatory functions of KLRG1 cadherin interactions are dependent on forward and reverse signaling. *Blood* 114:5299–306. doi: 10.1182/blood-2009-06-228353
- Barber DF, Long EO (2003) Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells. *J Immunol* 170:294–9.
- Bassi P (2002) BCG (Bacillus of Calmette Guérin) therapy of high-risk superficial bladder cancer. *Surg Oncol* 11:77–83. doi: 10.1016/S0960-7404(02)00008-7
- Batoni G, Esin S, Favilli F, et al (2005) Human CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> natural killer cell subsets respond differentially to direct stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Scand J Immunol* 62:498–506. doi: 10.1111/j.1365-3083.2005.01692.x
- Battella S, Cox MC, Santoni A, Palmieri G (2016) Natural killer (NK) cells and anti-tumor therapeutic mAb: unexplored interactions. *J Leukoc Biol* 99:87–96. doi: 10.1189/jlb.5VMR0415-141R

- Bauer S, Groh V, Wu J, et al (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727–9.
- Beatty JD, Islam S, North ME, et al (2004) Urine dendritic cells: a noninvasive probe for immune activity in bladder cancer? *BJU Int* 94:1377–83. doi: 10.1111/j.1464-410X.2004.05176.x
- Benson DM, Bakan CE, Mishra A, et al (2010) The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116:2286–94. doi: 10.1182/blood-2010-02-271874
- Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, et al (2006) Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol* 177:7833–40.
- Bevens RFM, Boer EC de, Kurth KH, Schamhart DHJ (1998) BCG-induced interleukin-6 upregulation and BCG internalization in well and poorly differentiated human bladder cancer cell lines. *Eur Cytokine Netw* 9:181–6.
- Bevens RFM, Kurth K-H, Schamhart DHJ (2004) Role of urothelial cells in BCG immunotherapy for superficial bladder cancer. *Br J Cancer* 91:607–12. doi: 10.1038/sj.bjc.6602026
- Bisiaux A, Thiounn N, Timsit M-O, et al (2009) Molecular analyte profiling of the early events and tissue conditioning following intravesical bacillus calmette-guerin therapy in patients with superficial bladder cancer. *J Urol* 181:1571–80. doi: 10.1016/j.juro.2008.11.124
- Boccafroschi C, Montefiore F, Pavesi M, et al (1992) Immunophenotypic characterization of the bladder mucosa infiltrating lymphocytes after intravesical BCG treatment for superficial bladder carcinoma. *Eur Urol* 21:304–8.
- Bocchino M, Galati D, Sanduzzi A, et al (2005) Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 9:375–83.
- Böhle A, Gerdes J, Ulmer AJ, et al (1990) Effects of local bacillus Calmette-Guerin therapy in patients with bladder carcinoma on immunocompetent cells of the bladder wall. *J Urol* 144:53–8.
- Böhle A, Jocham D, Bock PR (2003) Intravesical bacillus Calmette-Guerin versus mitomycin C for superficial bladder cancer: a formal meta-analysis of comparative studies on recurrence and toxicity. *J Urol* 169:90–5. doi: 10.1097/01.ju.0000039680.90768.b3
- Böhle A, Thanhäuser A, Ulmer AJ, et al (1993) Dissecting the immunobiological effects of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) *in vitro*: evidence of a distinct BCG-activated killer (BAK) cell phenomenon. *J Urol* 150:1932–7.
- Böhle A, Thanhäuser A, Ulmer AJ, et al (1994) On the mode of action of intravesical bacillus Calmette-Guérin: *in vitro* characterization of BCG-activated killer cells. *Urol Res* 22:185–90.
- Bottino C, Castriconi R, Pende D, et al (2003) Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med* 198:557–67. doi: 10.1084/jem.20030788

- Boyman O, Sprent J (2012) The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 12:180–90. doi: 10.1038/nri3156
- Brandau S, Böhle A (2001) Activation of natural killer cells by *Bacillus Calmette-Guérin*. *Eur Urol* 39:518–24. doi: 52497
- Brandau S, Riemensberger J, Jacobsen M, et al (2001) NK cells are essential for effective BCG immunotherapy. *Int J Cancer* 92:697–702.
- Brandau S, Suttman H (2007) Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother = Biomédecine pharmacothérapie* 61:299–305. doi: 10.1016/j.biopha.2007.05.004
- Brandau S, Suttman H, Riemensberger J, et al (2000) Perforin-mediated lysis of tumor cells by *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin-activated killer cells. *Clin Cancer Res* 6:3729–38.
- Brandt CS, Baratin M, Yi EC, et al (2009) The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med* 206:1495–503. doi: 10.1084/jem.20090681
- Bryceson YT, Ljunggren H-G, Long EO (2009) Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood* 114:2657–66. doi: 10.1182/blood-2009-01-201632
- Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO (2006) Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159–66. doi: 10.1182/blood-2005-04-1351
- Bubeník J, Barešová M, Viklický V, et al (1973) Established cell line of urinary bladder carcinoma (T24) containing tumour-specific antigen. *Int J Cancer* 11:765–773. doi: 10.1002/ijc.2910110327
- Burnet FM (1967) Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* (London, England) 1:1171–4.
- Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1–27.

## C

- Caligiuri MA (2008) Human natural killer cells. *Blood* 112:461–9. doi: 10.1182/blood-2007-09-077438
- Calmette A (1922) L'infection bacillaire et la tuberculose chez l'homme et chez les animaux.
- Carretero M, Cantoni C, Bellón T, et al (1997) The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur J Immunol* 27:563–7. doi: 10.1002/eji.1830270230
- Chan CJ, Andrews DM, McLaughlin NM, et al (2010) DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J Immunol* 184:902–11. doi: 10.4049/jimmunol.0903225

- Chen Z, Ding W, Xu K, et al (2012) The 1973 WHO Classification is more suitable than the 2004 WHO Classification for predicting prognosis in non-muscle-invasive bladder cancer. *PLoS One* 7:e47199. doi: 10.1371/journal.pone.0047199
- Chisholm SE, Reyburn HT (2006) Recognition of vaccinia virus-infected cells by human natural killer cells depends on natural cytotoxicity receptors. *J Virol* 80:2225–33. doi: 10.1128/JVI.80.5.2225-2233.2006
- Chizzonite R, Truitt T, Podlaski FJ, et al (1991) IL-12: monoclonal antibodies specific for the 40-kDa subunit block receptor binding and biologic activity on activated human lymphoblasts. *J Immunol* 147:1548–56.
- Colonna M, Samaridis J (1995) Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* (80- ) 268:405–408. doi: 10.1126/science.7716543
- Colotta F, Allavena P, Sica A, et al (2009) Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 30:1073–81. doi: 10.1093/carcin/bgp127
- Coon BG, Crist S, González-Bonet AM, et al (2012) Fibronectin attachment protein from bacillus Calmette-Guerin as targeting agent for bladder tumor cells. *Int J Cancer* 131:591–600. doi: 10.1002/ijc.26413
- Cooper MA (2001) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56<sup>bright</sup> subset. *Blood* 97:3146–3151. doi: 10.1182/blood.V97.10.3146
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633–640. doi: 10.1016/S1471-4906(01)02060-9

## D

- Dai Z, Turtle CJ, Booth GC, et al (2009) Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *J Exp Med* 206:793–805. doi: 10.1084/jem.20081648
- Dall'Ozzo S, Tartas S, Paintaud G, et al (2004) Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship. *Cancer Res* 64:4664–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2862
- De Boer EC, De Jong WH, Van Der Meijden APM, et al (1991) Presence of activated lymphocytes in the urine of patients with superficial bladder cancer after intravesical immunotherapy with bacillus Calmette-Guérin. *Cancer Immunol Immunother* 33:411–416. doi: 10.1007/BF01741603
- De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L (2011) Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56<sup>(dim)</sup>CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- $\gamma$  on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:728–32. doi: 10.1073/pnas.1012356108
- Della Chiesa M, Marcenaro E, Sivori S, et al (2014) Human NK cell response to pathogens. *Semin Immunol* 26:152–60. doi: 10.1016/j.smim.2014.02.001

- Della Chiesa M, Sivori S, Carlomagno S, et al (2015) Activating KIRs and NKG2C in Viral Infections: Toward NK Cell Memory? *Front Immunol* 6:573. doi: 10.3389/fimmu.2015.00573
- Di Pierro GB, Gulia C, Cristini C, et al (2012) Bladder cancer: a simple model becomes complex. *Curr Genomics* 13:395–415. doi: 10.2174/138920212801619232
- Diefenbach A, Raulet DH (2001) Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev* 181:170–84.
- Dorman SE, Holland SM (2000) Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 11:321–333. doi: 10.1016/S1359-6101(00)00010-1
- Dowell AC, Oldham KA, Bhatt RI, et al (2012) Long-term proliferation of functional human NK cells, with conversion of CD56<sup>(dim)</sup> NK cells to a CD56<sup>(bright)</sup> phenotype, induced by carcinoma cells co-expressing 4-1BBL and IL-12. *Cancer Immunol Immunother* 61:615–28. doi: 10.1007/s00262-011-1122-3
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, et al (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991–998. doi: 10.1038/ni1102-991
- Durek C, Brandau S, Ulmer AJ, et al (1999) Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) and 3D tumors: an *in vitro* model for the study of adhesion and invasion. *J Urol* 162:600–5. doi: 10.1016/S0022-5347(05)68633-8

## E

- Edelman GM (1986) Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. *Annu Rev Cell Biol* 2:81–116. doi: 10.1146/annurev.cb.02.110186.000501
- Esin S, Batoni G, Pardini M, et al (2004) Functional characterization of human natural killer cells responding to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *Immunology* 112:143–52. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01858.x
- Esuvaranathan K., Alexandroff AB, McIntyre M, et al (1995) Interleukin-6 Production by Bladder Tumors is Upregulated by BCG Immunotherapy. *J Urol* 154:572–575. doi: 10.1016/S0022-5347(01)67113-1

## F

- Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, et al (2003) CD56<sup>bright</sup> natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101:3052–7. doi: 10.1182/blood-2002-09-2876
- Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, et al (1999) Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol* 162:4511–4520. doi: 10.4049/jimmunol.173.6.4066



Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al (2013) GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]. In: Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer.

Fernández-Messina L, Reyburn HT, Valés-Gómez M (2012) Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol* 3:299. doi: 10.3389/fimmu.2012.00299

Förster R, Davalos-Misslitz AC, Rot A (2008) CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol* 8:362–371. doi: 10.1038/nri2297

Freud AG, Yu J, Caligiuri MA (2014) Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Semin Immunol* 26:132–7. doi: 10.1016/j.smim.2014.02.008

## G

García-Cuesta EM, López-Cobo S, Álvarez-Maestro M, et al (2015) NKG2D is a Key Receptor for Recognition of Bladder Cancer Cells by IL-2-Activated NK Cells and BCG Promotes NK Cell Activation. *Front Immunol* 6:284. doi: 10.3389/fimmu.2015.00284

Gercken J, Pryjma J, Ernst M, Flad HD (1994) Defective antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes. *Infect Immun* 62:3472–8.

Giacomini P, Beretta A, Nicotra MR, et al (1997) HLA-C heavy chains free of beta2-microglobulin: distribution in normal tissues and neoplastic lesions of non-lymphoid origin and interferon-gamma responsiveness. *Tissue Antigens* 50:555–66.

Grillo-López AJ, White CA, Dallaire BK, et al (2000) Rituximab: the first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Curr Pharm Biotechnol* 1:1–9.

Groh V, Bahram S, Bauer S, et al (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 93:12445–12450. doi: 10.1073/pnas.93.22.12445

Grossman HB, Wedemeyer G, Ren L, et al (1986) Improved growth of human urothelial carcinoma cell cultures. *J Urol* 136:953–9.

Gumá M, Budt M, Sáez A, et al (2006) Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107:3624–31. doi: 10.1182/blood-2005-09-3682

## H

Haoues M, Refai A, Mallavialle A, et al (2014) Forkhead box O3 (FOXO3) transcription factor mediates apoptosis in BCG-infected macrophages. *Cell Microbiol* 16:1378–90. doi: 10.1111/cmi.12298

Harikrishna J, Sukaveni V, Prabath Kumar D, Mohan A (2012) Cancer and Tuberculosis. *JACM* 13:142–4.

- Hayakawa Y, Huntington ND, Nutt SL, Smyth MJ (2006) Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev* 214:47–55. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00454.x
- Hedges S, Agace W, Svensson M, et al (1994) Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. *Infect Immun* 62:2315–21.
- Helander TS, Timonen T (1998) Adhesion in NK cell function. *Curr Top Microbiol Immunol* 230:89–99.
- Hemler ME (1990) VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* 8:365–400. doi: 10.1146/annurev.iy.08.040190.002053
- Herr HW, Morales A (2008) History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story. *J Urol* 179:53–6. doi: 10.1016/j.juro.2007.08.122
- Higuchi T, Shimizu M, Owaki A, et al (2009) A possible mechanism of intravesical BCG therapy for human bladder carcinoma: involvement of innate effector cells for the inhibition of tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 58:1245–55. doi: 10.1007/s00262-008-0643-x
- Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, et al (2013) Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* 5:208ra145. doi: 10.1126/scitranslmed.3006702
- Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Rodriguez AP, et al (2014) Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS One* 9:e108326. doi: 10.1371/journal.pone.0108326

## I

- Inngjerdingen M (2001) Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97:367–375. doi: 10.1182/blood.V97.2.367
- Ito M, Maruyama T, Saito N, et al (2006) Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 203:289–95. doi: 10.1084/jem.20051986

## J

- Jackson A, Alexandroff A, Fleming D, et al (1994) Bacillus-calmette-guerin (bcg) organisms directly alter the growth of bladder-tumor cells. *Int J Oncol* 5:697–703.
- Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, et al (2001) CD56<sup>bright</sup> cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56<sup>dim</sup> NK cells. *Eur J Immunol* 31:3121–7. doi: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4
- Jiang S-J, Ye L-Y, Meng F-H (2016) Comparison of intravesical bacillus Calmette-Guerin and mitomycin C administration for non-muscle invasive bladder cancer: A meta-analysis and systematic review. *Oncol Lett* 11:2751–2756. doi: 10.3892/ol.2016.4325

## K

- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319:675–8. doi: 10.1038/319675a0
- Kemp TJ, Ludwig AT, Earel JK, et al (2005) Neutrophil stimulation with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) results in the release of functional soluble TRAIL/Apo-2L. *Blood* 106:3474–82. doi: 10.1182/blood-2005-03-1327
- Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD (2016) The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.25
- Khazen R, Müller S, Gaudenzio N, et al (2016) Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nat Commun* 7:10823. doi: 10.1038/ncomms10823
- Kremer L, Estaquier J, Brandt E, et al (1997) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur J Immunol* 27:2450–6. doi: 10.1002/eji.1830270945
- Kurth KH, Bouffieux C, Sylvester R, et al (2000) Treatment of superficial bladder tumors: achievements and needs. The EORTC Genitourinary Group. *Eur Urol* 37 Suppl 3:1–9. doi: 52386
- 162 | Kyriazis AA, Kyriazis AP, McCombs WB, Peterson WD (1984) Morphological, biological, and biochemical characteristics of human bladder transitional cell carcinomas grown in tissue culture and in nude mice. *Cancer Res* 44:3997–4005.

## L

- Lakshmikanth T, Burke S, Ali TH, et al (2009) NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Invest* 119:1251–63. doi: 10.1172/JCI36022
- Lamm DL, Blumenstein BA, Crissman JD, et al (2000) Maintenance bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for recurrent TA, T1 and carcinoma in situ transitional cell carcinoma of the bladder: a randomized Southwest Oncology Group Study. *J Urol* 163:1124–9.
- Lanier LL, Chang C, Azuma M, et al (1991) Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J Immunol* 146:4421–6.
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, et al (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:4480–6.
- Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH (1989) Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. *J Exp Med* 169:2233–8.

- Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M (2014) Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? *Cancer Immunol Immunother* 63:419–35. doi: 10.1007/s00262-014-1523-1
- Lattime EC, Gomella LG, McCue PA (1992) Murine bladder carcinoma cells present antigen to BCG-specific CD4<sup>+</sup> T-cells. *Cancer Res* 52:4286–90.
- Lee SH, Yun S, Lee J, et al (2009) RasGRP1 is required for human NK cell function. *J Immunol* 183:7931–8. doi: 10.4049/jimmunol.0902012
- Lepin EJ, Bastin JM, Allan DS, et al (2000) Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur J Immunol* 30:3552–61. doi: 10.1002/1521-4141(200012)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L
- Liang F-X, RIEDEL I, DENG F-M, et al (2001) Organization of uroplakin subunits: transmembrane topology, pair formation and plaque composition. *Biochem J* 355:13–18. doi: 10.1042/bj3550013
- Lilly JD, Parsons CL (1990) Bladder surface glycosaminoglycans is a human epithelial permeability barrier. *Surg Gynecol Obstet* 171:493–6.
- Lima JF, Oliveira LMS, Pereira NZ, et al (2014) Distinct natural killer cells in HIV-exposed seronegative subjects with effector cytotoxic CD56<sup>(dim)</sup> and CD56<sup>(bright)</sup> cells and memory-like CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup>CD56<sup>(dim)</sup> cells. *J Acquir Immune Defic Syndr* 67:463–71. doi: 10.1097/QAI.0000000000000350
- Ljunggren HG, Kärre K (1985) Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* 162:1745–59.
- Ljunggren HG, Kärre K (1990) In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11:237–44.
- Long EO, Kim HS, Liu D, et al (2013) Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol* 31:227–58. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075005
- Luca S, Mihaescu T (2013) History of BCG Vaccine. *Mædica* 8:53–8.
- Luo Y, Chen X, O'Donnell MA (2003) Role of Th1 and Th2 cytokines in BCG-induced IFN- $\gamma$  production: cytokine promotion and simulation of BCG effect. *Cytokine* 21:17–26. doi: 10.1016/S1043-4666(02)00490-8
- Luo Y, Han R, Evanoff DP, Chen X (2010) Interleukin-10 inhibits *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG)-induced macrophage cytotoxicity against bladder cancer cells. *Clin Exp Immunol* 160:359–68. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04105.x

## M

- MacLennan GT, Kirkali Z, Cheng L (2007) Histologic grading of noninvasive papillary urothelial neoplasms. *Eur Urol* 51:889–97; discussion 897–8. doi: 10.1016/j.eururo.2006.10.037
- Maghazachi AA (2010) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 341:37–58. doi: 10.1007/82\_2010\_20

- Manches O, Lui G, Chaperot L, et al (2003) *In vitro* mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101:949–54. doi: 10.1182/blood-2002-02-0469
- Mandal A, Viswanathan C (2015) Natural killer cells: In health and disease. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 8:47–55. doi: 10.1016/j.hemonc.2014.11.006
- Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, et al (2001) Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055–60. doi: 10.1038/35059110
- Marcolino I, Przybylski GK, Koschella M, et al (2004) Frequent expression of the natural killer cell receptor KLRG1 in human cord blood T cells: correlation with replicative history. *Eur J Immunol* 34:2672–80. doi: 10.1002/eji.200425282
- Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al (2004) Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260–5. doi: 10.1038/ni1138
- Martinez-Piñeiro JA, Muntañola P (1977) Nonspecific immunotherapy with BCG vaccine in bladder tumors: a preliminary report. *Eur Urol* 3:11–22.
- Martínez-Piñeiro L, Portillo JA, Fernández JM, et al (2015) Maintenance Therapy with 3-monthly Bacillus Calmette-Guérin for 3 Years is Not Superior to Standard Induction Therapy in High-risk Non-muscle-invasive Urothelial Bladder Carcinoma: Final Results of Randomised CUETO Study 98013. *Eur Urol* 68:256–62. doi: 10.1016/j.eururo.2015.02.040
- Masters JR, Hepburn PJ, Walker L, et al (1986) Tissue culture model of transitional cell carcinoma: characterization of twenty-two human urothelial cell lines. *Cancer Res* 46:3630–6.
- Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al (1969) Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)* 1:697–9.
- McCarthy EF (2006) The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 26:154–8.
- McNerney ME, Kumar V (2006) The CD2 family of natural killer cell receptors. *Curr Top Microbiol Immunol* 298:91–120.
- McVicar DW, Taylor LS, Gosselin P, et al (1998) DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* 273:32934–42.
- Michel T, Poli A, Cuapio A, et al (2016) Human CD56<sup>bright</sup> NK Cells: An Update. *J Immunol* 196:2923–31. doi: 10.4049/jimmunol.1502570
- Mistry AR, O'Callaghan CA (2007) Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 121:439–47. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x
- Miyazaki J, Kawai K, Kojima T, et al (2011) The liposome-incorporating cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin can directly enhance the susceptibility of cancer cells to lymphokine-activated killer cells through up-regulation of natural-killer group 2, member D ligands. *BJU Int* 108:1520–1526. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.10056.x

- Morales A, Eidinger D, Bruce AW (1976) Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol* 116:180–3.
- Moretta A (1995) Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med* 182:875–884. doi: 10.1084/jem.182.3.875
- Moretta A, Biassoni R, Bottino C, et al (2000) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Today* 21:228–234. doi: 10.1016/S0167-5699(00)01596-6
- Morton D, Eilber FR, Malmgren RA, Wood WC (1970) Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery* 68:158–63; discussion 163–4.
- Mostofi FK, Sobin LH, Torloni H (1973) Histological typing of urinary bladder tumours. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/41533>. Accessed 18 Apr 2016

## N

- Navarro F, Llano M, Bellón T, et al (1999) The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur J Immunol* 29:277–83. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<277::AID-IMMU277>3.0.CO;2-4

## O

- O'Donnell MA, Luo Y, Chen X, et al (1999) Role of IL-12 in the induction and potentiation of IFN- $\gamma$  in response to bacillus Calmette-Guérin. *J Immunol* 163:4246–52.
- O'Toole C, Price ZH, Ohnuki Y, Unsgaard B (1978) Ultrastructure, karyology and immunology of a cell line originated from a human transitional-cell carcinoma. *Br J Cancer* 38:64–76.
- Ojo E, Wigzell H (1978) Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells. *Scand J Immunol* 7:297–306.
- Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B (1959) Effect of Bacillus Calmette-Guerin infection on transplanted tumours in the mouse. *Nature* 184(Suppl:291–2).

## P

- Parkin D. (2006) The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030–44. doi: 10.1002/ijc.21731
- Parkin DM (2008) The global burden of urinary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 12–20.
- Pearl R (1929) Cancer and Tuberculosis. *Am J Epidemiol* 9:97–159.

- Pérez-Villar JJ, Melero I, Navarro F, et al (1997) The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1. *J Immunol* 158:5736–43.
- Perussia B, Chen Y, Loza MJ (2005) Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Mol Immunol* 42:385–95. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.017
- Poli A, Michel T, Thérésine M, et al (2009) CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126:458–65. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.03027.x
- Pook S-H, Rahmat JNB, Esuvaranathan K, Mahendran R (2007) Internalization of *Mycobacterium bovis*, *Bacillus Calmette Guérin*, by bladder cancer cells is cytotoxic. *Oncol Rep* 18:1315–20.
- Prescott S, James K, Busuttil A, et al (1989) HLA-DR expression by high grade superficial bladder cancer treated with BCG. *Br J Urol* 63:264–9.
- Prescott S, James K, Hargreave TB, et al (1992) Intravesical Evans strain BCG therapy: quantitative immunohistochemical analysis of the immune response within the bladder wall. *J Urol* 147:1636–42.

## R

- Reddy M, Eirikis E, Davis C, et al (2004) Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an *in vitro* model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods* 293:127–42. doi: 10.1016/j.jim.2004.07.006
- Redelman-Sidi G, Glickman MS, Bochner BH (2014) The mechanism of action of BCG therapy for bladder cancer—a current perspective. *Nat Rev Urol* 11:153–62. doi: 10.1038/nrurol.2014.15
- Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al (1994) Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83:435–45.
- Rentsch CA, Birkhäuser FD, Biot C, et al (2014) *Bacillus Calmette-Guérin* strain differences have an impact on clinical outcome in bladder cancer immunotherapy. *Eur Urol* 66:677–88. doi: 10.1016/j.eururo.2014.02.061
- Riemensberger J, Böhle A, Brandau S (2002) IFN-gamma and IL-12 but not IL-10 are required for local tumour surveillance in a syngeneic model of orthotopic bladder cancer. *Clin Exp Immunol* 127:20–6.
- Rosenberg SA, Restifo NP (2015) Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* (80- ) 348:62–68. doi: 10.1126/science.aaa4967
- Rosevear HM, Lightfoot AJ, O'Donnell MA, Griffith TS (2009) The role of neutrophils and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in *bacillus Calmette-Guérin* (BCG) immunotherapy for urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Metastasis Rev* 28:345–53. doi: 10.1007/s10555-009-9195-6



- Ruhwald M, Aabye MG, Ravn P (2012) IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions. *Expert Rev Mol Diagn* 12:175–87. doi: 10.1586/erm.11.97
- Rygaard J, Povlsen CO (1974a) The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 82:99–106.
- Rygaard J, Povlsen CO (1974b) Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation* 17:135–6.

## S

- Sandes E, Lodillinsky C, Cwirenbaum R, et al (2007) Cathepsin B is involved in the apoptosis intrinsic pathway induced by Bacillus Calmette-Guérin in transitional cancer cell lines. *Int J Mol Med* 20:823–8.
- Shafi S, Vantourout P, Wallace G, et al (2011) An NKG2D-mediated human lymphoid stress surveillance response with high interindividual variation. *Sci Transl Med* 3:113ra124. doi: 10.1126/scitranslmed.3002922
- Shelley MD, Kynaston H, Court J, et al (2001) A systematic review of intravesical bacillus Calmette-Guérin plus transurethral resection vs transurethral resection alone in Ta and T1 bladder cancer. *BJU Int* 88:209–16.
- Sivori S, Carlomagno S, Moretta L, Moretta A (2006) Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells. *Eur J Immunol* 36:961–7. doi: 10.1002/eji.200535781
- Sivori S, Parolini S, Falco M, et al (2000) 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* 30:787–93. doi: 10.1002/1521-4141(200003)30:3<787::AID-IMMU787>3.0.CO;2-I
- Spreu J, Kuttruff S, Stejfova V, et al (2010) Interaction of C-type lectin-like receptors NKp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5100–5. doi: 10.1073/pnas.0913108107
- Strauss-Albee DM, Horowitz A, Parham P, Blish CA (2014) Coordinated regulation of NK receptor expression in the maturing human immune system. *J Immunol* 193:4871–9. doi: 10.4049/jimmunol.1401821
- Stutman O (1974) Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183:534–6.
- Suttmann H, Jacobsen M, Reiss K, et al (2004) Mechanisms of bacillus Calmette-Guerin mediated natural killer cell activation. *J Urol* 172:1490–5.
- Suttmann H, Riemensberger J, Bentien G, et al (2006) Neutrophil granulocytes are required for effective Bacillus Calmette-Guérin immunotherapy of bladder cancer and orchestrate local immune responses. *Cancer Res* 66:8250–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1416



Sylvester RJ (2011) Bacillus Calmette-Guérin treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Int J Urol* 18:113–20. doi: 10.1111/j.1442-2042.2010.02678.x

Sylvester RJ, van der MEIJDEN APM, Lamm DL (2002) Intravesical bacillus Calmette-Guerin reduces the risk of progression in patients with superficial bladder cancer: a meta-analysis of the published results of randomized clinical trials. *J Urol* 168:1964–70. doi: 10.1097/01.ju.0000034450.80198.1c

## T

Takahashi E, Kuranaga N, Satoh K, et al (2007) Induction of CD16<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK cells with antitumour cytotoxicity not only from CD16<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK cells but also from CD16<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK cells. *Scand J Immunol* 65:126–138. doi: 10.1111/j.1365-3083.2006.01883.x

Takayama H, Nishimura K, Tsujimura A, et al (2009) Increased infiltration of tumor associated macrophages is associated with poor prognosis of bladder carcinoma in situ after intravesical bacillus Calmette-Guerin instillation. *J Urol* 181:1894–900. doi: 10.1016/j.juro.2008.11.090

Tebo JM, Kim HS, Gao J, et al (1998) Interleukin-10 suppresses IP-10 gene transcription by inhibiting the production of class I interferon. *Blood* 92:4742–9.

Tessmer MS, Fugere C, Stevenaert F, et al (2007) KLRG1 binds cadherins and preferentially associates with SHIP-1. *Int Immunol* 19:391–400. doi: 10.1093/intimm/dxm004

168 | Thanhäuser A, Böhle A, Flad HD, et al (1993) Induction of bacillus-Calmette-Guérin-activated killer cells from human peripheral blood mononuclear cells against human bladder carcinoma cell lines *in vitro*. *Cancer Immunol Immunother* 37:105–11.

Thanhäuser A, Böhle A, Schneider B, et al (1995) The induction of bacillus-Calmette-Guérin-activated killer cells requires the presence of monocytes and T-helper type-1 cells. *Cancer Immunol Immunother* 40:103–108. doi: 10.1007/BF01520291

Thomas L (1982) On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55:329–33.

Tolley DA, Hargreave TB, Smith PH, et al (1988) Effect of intravesical mitomycin C on recurrence of newly diagnosed superficial bladder cancer: interim report from the Medical Research Council Subgroup on Superficial Bladder Cancer (Urological Cancer Working Party). *Br Med J (Clin Res Ed)* 296:1759–61.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108. doi: 10.3322/caac.21262

Trapani JA, Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2:735–47. doi: 10.1038/nri911

## V

Valés-Gómez M, Winterhalter A, Roda-Navarro P, et al (2006) The human cytomegalovirus glycoprotein UL16 traffics through the plasma membrane and the nuclear envelope. *Cell Microbiol* 8:581–90. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00645.x

- van den Broek MF, Kägi D, Zinkernagel RM, Hengartner H (1995) Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control *in vivo*. Eur J Immunol 25:3514–6. doi: 10.1002/eji.1830251246
- Vankayalapati R, Garg A, Porgador A, et al (2005) Role of NK cell-activating receptors and their ligands in the lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. J Immunol 175:4611–7.

## W

- Wagtmann N, Biassoni R, Cantoni C, et al (1995) Molecular clones of the p58 NK cell receptor reveal immunoglobulin-related molecules with diversity in both the extra- and intracellular domains. Immunity 2:439–49.
- Waldhauer I, Steinle A (2008) NK cells and cancer immunosurveillance. Oncogene 27:5932–43. doi: 10.1038/onc.2008.267
- Walzer T, Bléry M, Chaix J, et al (2007a) Identification, activation, and selective *in vivo* ablation of mouse NK cells via NKp46. Proc Natl Acad Sci U S A 104:3384–9. doi: 10.1073/pnas.0609692104
- Walzer T, Jaeger S, Chaix J, Vivier E (2007b) Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. Curr Opin Immunol 19:365–72. doi: 10.1016/j.coi.2007.04.004
- Wang J, Wakeham J, Harkness R, Xing Z (1999) Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. J Clin Invest 103:1023–9. doi: 10.1172/JCI6224
- Wang KS, Frank DA, Ritz J (2000) Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4. Blood 95:3183–90.
- Waterhouse NJ, Trapani JA (2002) CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story. Tissue Antigens 59:175–83.
- Welte S, Kuttruff S, Waldhauer I, Steinle A (2006) Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. Nat Immunol 7:1334–42. doi: 10.1038/ni1402
- Werfel T, Boeker M, Kapp A (1997) Rapid expression of the CD69 antigen on T cells and natural killer cells upon antigenic stimulation of peripheral blood mononuclear cell suspensions. Allergy 52:465–9.
- Wiemann B, Starnes CO (1994) Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. Pharmacol Ther 64:529–564. doi: 10.1016/0163-7258(94)90023-X

## Y

- Yu J, Freud AG, Caligiuri M a (2013) Location and cellular stages of natural killer cell development. Trends Immunol 34:573–82. doi: 10.1016/j.it.2013.07.005

**Z**

- Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, et al (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188:2375–80.
- Zbar B, Rapp HJ (1974) Immunotherapy of guinea pig cancer with BCG. *Cancer* 34:suppl:1532–40.
- Zhang Y, Khoo HE, Esuvaranathan K (1999) Effects of bacillus Calmette-Guérin and interferon alpha-2B on cytokine production in human bladder cancer cell lines. *J Urol* 161:977–83.
- Zuiverloon TCM, Nieuweboer AJM, Vékony H, et al (2012) Markers predicting response to bacillus Calmette-Guérin immunotherapy in high-risk bladder cancer patients: a systematic review. *Eur Urol* 61:128–45. doi: 10.1016/j.eururo.2011.09.026
- Zwirner NW, Domaica CI (2010) Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36:274–88. doi: 10.1002/biof.107